

# **Homozygote, leberspezifische *Smoothed*-Knock-out-Mäuse als Modell für eine hepatogen verursachte Ovarialinsuffizienz**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

**Doctor medicinae (Dr. med.)**

an der Medizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von: Franziska Eplinius

Geburtsdatum: 24. 09. 1984

Geburtsort: Berlin

angefertigt an den: Instituten für Biochemie und Anatomie  
Medizinische Fakultät der Universität Leipzig

Betreuer: Herr Prof. Dr. Rolf Gebhardt  
Herr PD Dr. Albert Ricken

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 17.11.2015

## INHALTSVERZEICHNIS

1	BIBLIOGRAPHISCHE ZUSAMMENFASSUNG	4
2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
3	EINLEITUNG	6
3.1	Das polyzystische Ovarsyndrom und die Mitbeteiligung der Leber	6
3.2	Das polyzystische Ovarsyndrom als Folgeerscheinung einer primären Leberkrankheit	9
3.3	Das polyzystische Ovarsyndrom als Folge von Störungen im Steroidhormonstoffwechsel während der Fetalzeit	10
3.4	Der murine Ovarialzyklus	12
3.5	Der Hedgehog-Signaltransduktionsweg	14
3.6	Homozygote, leberspezifische Morphogen-Knock-out-Mäuse als Tiermodell für leberinduzierte Krankheiten	15
4	AUFGABENSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	17
5	MATERIALIEN UND METHODEN	19
5.1	Mauslinie, -haltung, -tötung und -präparation	19
5.2	Aufarbeitung des Materials für die Lichtmikroskopie	20
5.2.1	Paraffineinbettung und Präparateherstellung	20
5.2.2	Histologische Färbungen	20
5.3	Bestimmung der Zyklusphase mittels Vaginalzytologie und -histologie	21
5.3.1	Anfertigung und Auswertung der Vaginalabstriche	21
5.3.2	Anfertigung und Auswertung der Vaginalschnittpräparate	21
5.4	Morphologische Analyse der Ovarfunktion	21
5.4.1	Auswahl der Ovarien	21
5.4.2	Aufarbeitung der Ovarien	22
5.4.3	Ermittlung der maximalen Längsschnittfläche	22
5.4.4	Auszählung und Beurteilung der Follikel in Entwicklung	22
5.4.5	Auszählung der Zona pellucidae im ovariellen Stroma	23

5.4.6	Auszählung der Gelbkörper	23
5.4.7	Bestimmung von Stromazelldichte und –größe	23
5.5	Isolierung von murinen Hepatozyten	24
5.6	Expressionsmessung von Proteinen der Steroidbiosynthese in der Leber und im Ovar	24
5.7	Ermittlung des Steroidhormon- und IGF-1-Spiegels im Serum	25
5.8	Statistische Auswertung	26
6	ERGEBNISSE	27
6.1	Zuchtverhalten der <i>Smoothened</i> -Knock-out-Mäuse	27
6.2	Makroskopie der inneren weiblichen Geschlechtsorgane	27
6.3	Vaginalzytologie und –morphologie	28
6.4	Mikroskopie der Ovarien	30
6.4.1	Kleine Ovarien	30
6.4.2	Fehlen von Gelbkörpern (Corpora lutea)	30
6.4.3	Geringere Entwicklungskompetenz der Follikel	34
6.4.4	Interstitielle Hypertrophie	38
6.5	Transkriptionsmuster von Proteinen der Steroidbiosynthese	39
6.6	Steroidhormon- und IGF-1-Werte im Serum	40
7	DISKUSSION	41
8	AUSBLICK	47
9	ZUSAMMENFASSUNG	48
10	LITERATURVERZEICHNIS	51
11	ERKLÄRUNG ÜBER DIE EIGENSTÄNDIGE ABFASSUNG DER ARBEIT	62
12	CURRICULUM VITAE	63
13	DANKSAGUNG	65

## 1. BIBLIOGRAPHISCHE ZUSAMMENFASSUNG

Eplinius, Franziska

Homozygote, leberspezifische *Smoothened*-Knock-out-Mäuse als Modell für eine hepatogen verursachte Ovarialinsuffizienz

Universität Leipzig, Dissertation

65 S., 153 Lit., 14 Abb., 3 Tab.

### REFERAT

Die Arbeit befasst sich mit den Auswirkungen eines pränatal gesetzten Leberschadens auf die Fertilität adulter weiblicher Mäuse.

Es wurden die Ovarien und Vaginen von Mäusen histologisch untersucht, bei welchen es durch einen leberspezifischen, embryonalen Knock-out (KO) des Membranproteins Smoothened und daraus folgender Ausschaltung des Hedgehog- (Hh-) Signaltransduktionswegs in der fetalen Leber unter anderem zu einer Infertilität der homozygoten, weiblichen KO-Mäuse kam. Die Vaginalhistologie der KO-Mäuse weist auf einen fehlenden Ovarialzyklus hin. Die Ovarien sind signifikant kleiner als die Ovarien der Wildtyp-Mäuse und zeigen ein vollständiges Fehlen von Gelbkörpern. Die Anzahl der heranwachsenden und reifenden Follikel ist eher erniedrigt und die Atresierate in den Gonadotropin-abhängigen Follikeln mit Durchmesser > 249 µm ist signifikant erhöht. Unter den größten Gonadotropin-abhängigen Follikeln > 350 µm im Durchmesser beträgt die Atresierate 100 %. Das ovarielle Stroma besteht aus hellen, großen, in Ballen zusammenliegenden Zellen.

In der Leber findet sich eine gesteigerte Expression des Enzyms 17alpha-Hydroxylase bzw. 17/ 20-Lyase (CYP17A1) und damit ein erhöhter Spiegel des Androgens Dehydroepiandrosteron (DHEA) im Serum. Das Enzym 3β-Hydroxysteroiddehydrogenase, welches die weitere Umsetzung von DHEA katalysiert, wird zudem vermindert exprimiert. Die Konzentration des Insulin-like growth factors 1 (IGF-1) im Serum ist signifikant erniedrigt, während die Konzentration seines Bindungsproteins IGFBP-1 im Serum erhöht ist.

Diese Befunde sprechen für eine schwere, am ehesten hormonell bedingte Störung der terminalen Follikelreifung mit daraus folgender Anovulation und Infertilität.

Insgesamt finden sich Veränderungen, welche Ähnlichkeiten zum polyzystischen Ovarsyndrom (PCOS) beim Menschen zeigen, welches unter anderem durch Anovulation und Hyperandrogenämie gekennzeichnet ist. Zudem könnte dieses Mausmodell einen Einblick in die systemischen Einflüsse des hepatischen Hh-Signaltransduktionswegs bieten.

## 2. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>AFP</b>	Alpha-Fetoprotein
<b>Alb</b>	Albumin
<b>ASRM</b>	American Society for Reproductive Medicine
<b>cDNA</b>	Complementary desoxyribonucleic acid
<b>Cre</b>	Cyclization recombination
<b>CYP</b>	Cytochrom P 450
<b>DHEA</b>	Dehydroepiandrosteron
<b>DNA</b>	Desoxyribonucleic acid
<b>ESHRE</b>	European Society of Human Reproduction and Embryology
<b>FSH</b>	Follikel-stimulierendes Hormon
<b>Gli</b>	Glioblastom-Transkriptionsfaktor
<b>HE</b>	Hämatoxylin-Eosin
<b>hGH</b>	Human growth hormone
<b>Hh</b>	Hedgehog
<b>3<math>\beta</math>-HSD</b>	3 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase
<b>IGF-1</b>	Insulin-like growth factor 1
<b>IGFBP-1</b>	Insulin-like-growth-factor-binding protein 1
<b>IGF1/2R</b>	Insulin-like growth factor receptor 1/2
<b>LH</b>	Luteinisierendes Hormon
<b>mRNA</b>	Messenger ribonucleic acid
<b>NAFL</b>	Non-alcoholic fatty liver disease
<b>NIH</b>	National Institute of Health
<b>PAS</b>	Periodic acid Schiff-stain
<b>PCOS</b>	Polycystic ovary syndrome
<b>qRTPCR</b>	Quantitative real-time polymerase-chain-reaction
<b>SAC</b>	Smo-Alb/AFP-Cre
<b>SHBG</b>	Steroidhormon-bindendes Globulin
<b>Smo</b>	Smoothed
<b>StAR</b>	Steroidogenic acute regulatory protein
<b>STK 36</b>	Serin-Threonin-Kinase 36
<b>Su(fu)</b>	Suppressor of fused

### 3. EINLEITUNG

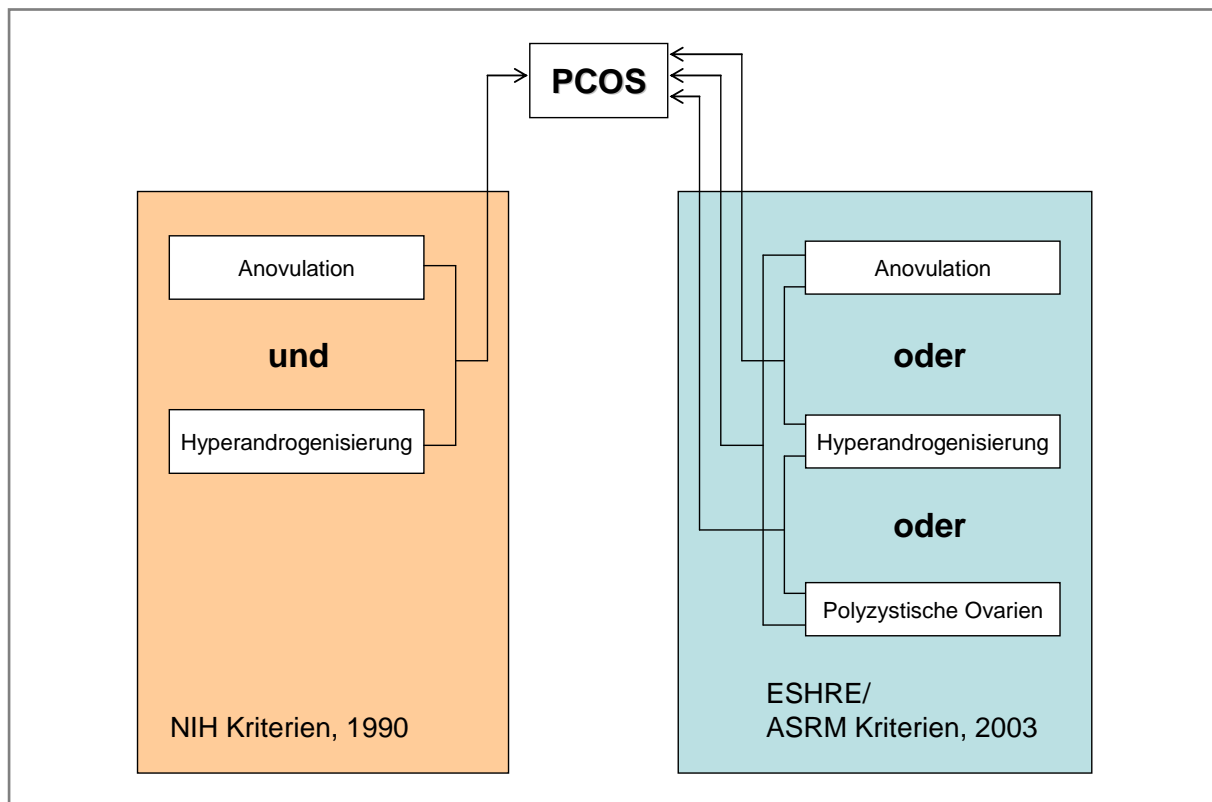
#### 3.1 Das polyzystische Ovarsyndrom und die Mitbeteiligung der Leber

Das polyzystische Ovarsyndrom (engl. polycystic ovary syndrome, PCOS), auch Stein-Leventhal-Syndrom genannt, ist mit einer Prävalenz von 5-10 % der Frauen im gebärfähigen Alter eines der häufigsten endokrinologischen Leiden der Frau (Azziz et al., 2004; Franks, 1995; Goodarzi et al., 2011; Sathyapalan and Atkin, 2012).

Der Begriff PCOS umfasst mehr einen Symptomenkomplex infolge verschiedener Ursachen als eine Krankheit (Franks, 1995; Franks, 2008, Porter, 2008; Stein and Leventhal, 1935). Ein PCOS ist anhand seiner markanten Klinik mit Zyklusstörungen, männlichem Behaarungsmuster und unerfülltem Kinderwunsch an sich leicht zu erkennen. Ein PCOS wird diagnostiziert, wenn eine Frau im gebärfähigen Alter *erstens*: unter verlängerten Abständen zwischen den Regelblutungen bis hin zu einer ausbleibenden Menstruation leidet; *zweitens*: klinische Zeichen der Vermännlichung (Virilisierung, insbesondere männliches Behaarungsmuster, Alopezie und/oder Akne) und/oder einen erhöhten Androgenspiegel zeigt und *drittens*: keine andere Erkrankung des Ovars, der Nebenniere und/oder der Hypophyse vorliegt, die mit einer Virilisierung einhergehen kann (Tab. 1; Franks, 1995, Artini et al., 2010; Sheehan, 2004). Der beispielsweise sonografische Nachweis von Ovarien, übersät mit zystischen, großen Follikeln und wenigen oder gar keinen Gelbkörpern (polyzystische Ovarien) wird zur Diagnose eines PCOS nach den Kriterien des National Institutes of Health (NIH), der European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) und der American Society for Reproductive Medicine (ASRM) nicht mehr zwingend zu den oben genannten Kriterien hinzu gefordert, soll aber die Genauigkeit der Diagnose erheblich erhöhen (Belosi et al., 2006). Inwieweit sowohl Frauen mit polyzystischen Ovarien und Zyklusstörung, jedoch ohne erhöhte Androgenspiegel, als auch Frauen mit polyzystischen Ovarien und Hyperandrogenismus, jedoch ohne chronische Anovulation, als PCOS-Patientinnen geführt werden sollen, wird diskutiert (Abb. 1; Goodarzi et al., 2011, Sathyapalan and Atkin, 2012).

Mehr als die Hälfte der Frauen mit einem PCOS sind übergewichtig oder adipös (Franks, 1995; Hahn et al., 2007) und zeigen dann häufig eine periphere und zentrale Insulinresistenz, einen Hyperinsulinismus, erhöhte Blutfettwerte und einen erhöhten Blutdruck (Tab. 1). Das Risiko an einem Diabetes mellitus Typ 2 und/oder an einem Herzgefäßleiden zu erkranken ist deutlich erhöht; oft liegen abnorme Leberwerte und in 20% der Fälle eine nicht-alkoholische Fettleber (engl. Non- alcoholic fatty liver, NAFL) vor (Brzozowska et al., 2009; Cerda et al., 2007; Ciotta et al., 2011; Gambarin-Gelwan et al., 2007; Lerchbaum et al., 2011; Setji et al., 2006; Tan et al., 2010).

Die Fettleber scheint dabei eher durch das Übergewicht und den Hyperinsulinismus verursacht zu werden als durch den mit dem PCOS verbundenen Hyperandrogenismus (Economou et al., 2009; Kauffman et al., 2010).



**Abb. 1:** Synopsis der gegenwärtig gebräuchlichsten Kriterien für die Diagnose PCOS nach Ausschluss anderer virilisierender Erkrankungen. Laut NIH klinischer oder metabolischer Hyperandrogenismus und Anovulation, gemäß den ESHRE/ASRM-Kriterien zudem mit Follikelzysten übersäte Ovarien.

	Klinische Befunde	Laborchemische Befunde
primär	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Oligo-/Amenorrhoe</li> <li>• Virilisierung mit <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hirsutismus</li> <li>- Alopezie</li> <li>- Akne</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hyperandrogenämie</li> <li>• ggf. Progesteronmangel</li> </ul>
sekundär	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Polyzystische Ovarien</li> <li>• Adipositas</li> <li>• Diabetes mellitus Typ II</li> <li>• art. Hypertonie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hyperinsulinämie, Glucosämie</li> <li>• Dyslipoproteinämie</li> </ul>

**Tab. 1:** Bei PCOS gehäuft auftretende primäre und sekundäre klinische und laborchemische Befunde.

Die genaue Ätiopathogenese des PCOS ist unklar; man vermutet eine Störung im hypothalamo-hypophysär-ovariellen Regelkreis. Typischerweise ist das Verhältnis der Gonadotropine zu Gunsten des hypophysären luteinisierenden Hormons (LH) im Blut der Patientinnen verschoben (Franks, 1995). Die erhöhten LH-Blutspiegel steigern im Ovar die Androgensynthese in den Thekazellen der größeren heranreifenden Follikel, aber auch in den Zwischenzellen des Ovars und in der Nebenniere. Die dadurch vermehrt ins Blut gelangenden Androgene werden im Fettgewebe teilweise in Östrogene umgewandelt. Deren Zyklus-unabhängige Bildung und Abgabe ins Blut steigern die hypophysäre LH-Ausschüttung weiter. Ebenso stimuliert der gehäuft beim PCOS hinzukommende Hyperinsulinismus die Androgensynthese sowohl im Ovar als auch in der Nebenniere und verstärkt so die Störung im hypothalamo-hypophysär-ovariellen Regelkreis (Asagami et al., 2008). Überdies trägt die gehäuft auftretende NAFL zum gestörten Steroidstoffwechsel bei; so wird Sexualhormon-bindendes Globulin (SHBG) in der Fettleber vermindert gebildet, was den Anteil der biologisch aktiven Androgene bzw. Östrogene im Blut verschiebt (Vassilatou et al., 2010).

Zudem zeigen am PCOS erkrankte Frauen erhöhte Serumkonzentrationen von IGF-1 (engl. Insulin-like growth factor-1) und erniedrigte Serumkonzentrationen seines Bindungsproteins IGFBP-1 (engl. Insulin-like growth factor binding protein 1) und weisen somit erhöhte Konzentrationen an aktivem und verfügbarem IGF-1 auf (Berker et al., 2004; Iwashita et al., 1990; Orio et al., 2003; Thierry van Dessel et al., 1999). Eine Reduktion des lokal verfügbaren IGF-1 führt dagegen zu mindergewichtigen Reproduktionsorganen und einem Ausbleiben respektive Versiegen des ovariellen Zyklus (Bienvenu et al., 2004). IGF-1 ist ein Wachstumsfaktor mit Ähnlichkeiten zum Insulin. Er wird unter anderem in der Leber gebildet und wirkt über zwei membranständige Rezeptoren (IGF1R und IGF2R) auf seine Zielorgane ein. Systemisches IGF-1 fördert zusammen mit vor Ort gebildetem IGF-1 den Aufbau der Gebärmutterschleimhaut. Im Ovar fördert IGF-1 die Zellteilung von Granulosazellen in wachsenden Follikeln und wirkt zudem erhaltend auf die Eizelle ein (Kadokia et al., 2001; Zhou et al., 2000; Thierry van Dessel et al., 1996).

Eine erhöhte Prävalenz bei positiver PCOS-Familienanamnese spricht für eine genetische Komponente in der Ätiologie des PCOS, auch wenn der genaue Mechanismus noch weitestgehend unbekannt ist (Franks, 1995). Diskutiert wird ein autosomal-dominanter Vererbungsmodus mit unterschiedlicher phänotypischer Penetranz (Govind et al., 1999; Legro et al., 1998). So besteht für eine Frau mit einer an PCOS erkrankten Mutter ein signifikant höheres Risiko ein PCOS zu entwickeln (Azziz and Kashar-Miller, 2000; Kashar-Miller and Azziz, 1999).

*Zusammenfassend ist festzustellen, dass der Symptomenkomplex eines PCOS gehäuft mit einer NAFL auftritt, und zwar besonders bei übergewichtigen Frauen.*



### **3.2 Das polyzystische Ovarsyndrom als Folgeerscheinung einer primären Leberkrankheit**

Die Leber hat einen festen Platz in der stammesgeschichtlichen Entwicklung der weiblichen Reproduktion (Della Torre et al., 2011). So bildet bei Rosenberggarnelen der Hepatopankreas die Eidotterproteine für das Ovar (Jasmani et al., 2004; Jayasankar et al., 2006; Soroka et al., 2000). Bei Säugetieren regelt die Leber das Zyklusgeschehen in Abhängigkeit von der Nahrungsaufnahme mit (Della Torre et al., 2011). Östrogenrezeptoren auf den Hepatozyten sind in die Regulationsschritte mit eingebunden.

Wie in Kapitel 3.1. dargestellt, soll das PCOS durch Störungen im hypothalamo-hypophysär-ovariellen Regelkreis verursacht sein. Die dabei gehäuft vorkommende NAFL wird als eine der möglichen Sekundärfolgen beschrieben (Ciotta et al., 2011).

Nur wenige Untersuchungen weisen darauf hin, dass sich eine PCOS-ähnliche Symptomatik auch im Rahmen eines primären Leberschadens entwickeln kann. So können Zyklusstörungen und ein nicht erfüllter Kinderwunsch als erstes auf einen Leberschaden bei Frauen im gebärfähigen Alter hinweisen (Laifer and Guido, 1995). Bei einem Teil dieser Patientinnen zeigen sich erhöhte Androgenspiegel und eine verminderte Ovarfunktion, wie sie für PCOS-Patientinnen typisch sind. Der Symptomenkomplex eines PCOS wird bei ca. 70 % der Frauen mit einer primär diagnostizierten, NAFL gefunden, wenn diese gezielt auf chronische Anovulation und Hyperandrogenismus befragt bzw. untersucht werden (Brzozowska et al., 2009). Weshalb bei lebererkrankten Patientinnen die Fertilität beeinträchtigt ist, bleibt häufig unklar, insbesondere auch bei einer nicht-alkoholischen Ursache des Leberschadens (Cundy et al., 1991). Kommt es bei progredienter Schwere der Lebererkrankung zu einer Lebertransplantation, so normalisiert sich bei weit über der Hälfte der Patientinnen die Ovarfunktion (de Koning and Haagsma, 1990; Parolin et al., 2004) bzw. ihre Fertilität (Douglas et al., 2007; Gerlei et al., 2011; Laifer and Guido, 1995). Dies weist darauf hin, dass zumindest bei diesen lebertransplantierten Patientinnen die Ursache für die Infertilität tatsächlich in der Leber lag, anstatt im Ovar oder im hypothalamo-hypophysär-ovariellen-Regelkreis.

*Zusammenfassend ist festzustellen, dass der Symptomenkomplex eines PCOS auch bei einer primären Leberschädigung auftreten kann.*

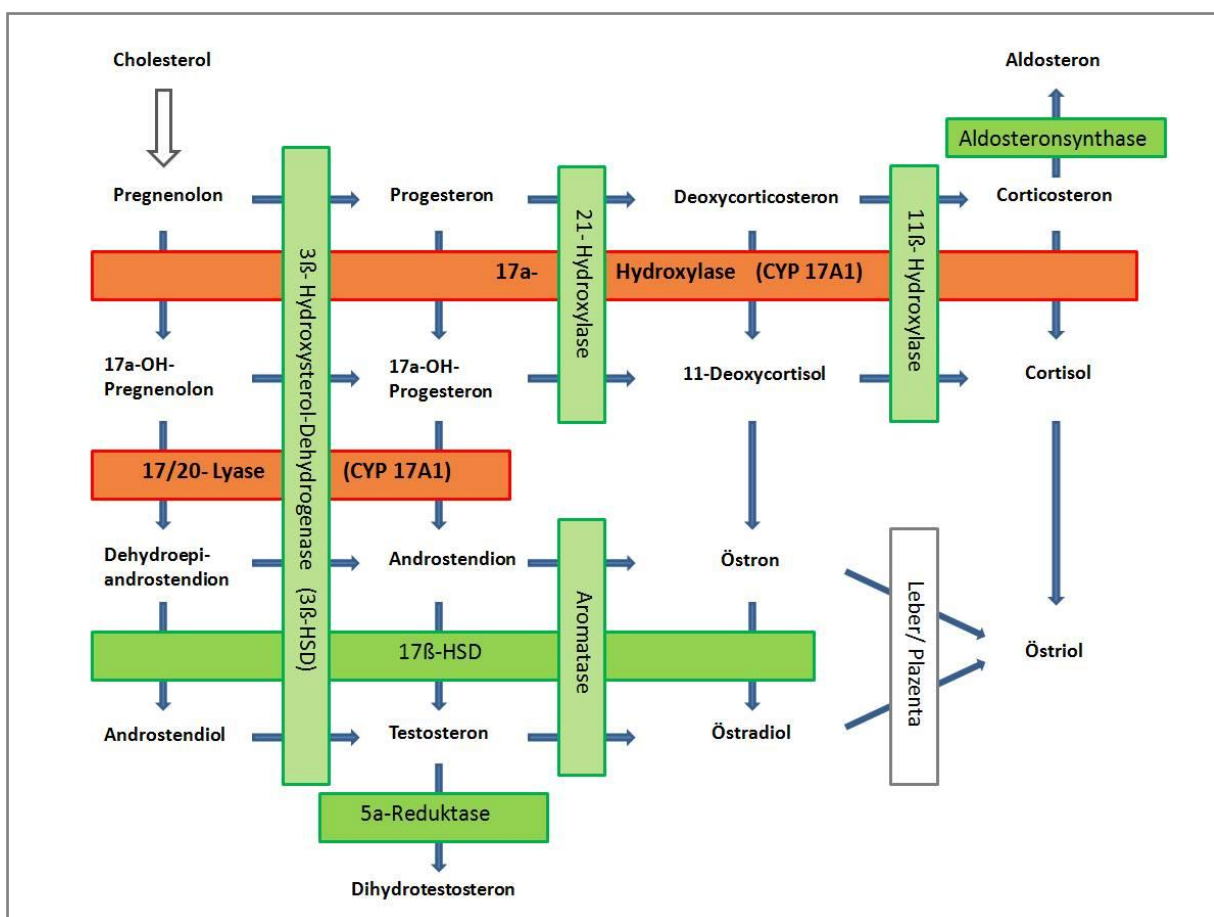
### **3.3 Das polyzystische Ovarsyndrom als Folge von Störungen im Steroidhormonstoffwechsel während der Fetalzeit**

Störungen im mütterlichen und fetalen Organismus während der Embryonalentwicklung sowie während der Neonatalperiode, welche in späteren Lebensabschnitten von Mensch und Tier symptomatisch werden können, werden immer häufiger als Mitverursacher von Krankheiten wie Diabetes mellitus Typ 2 oder arterieller Hypertonie erkannt (Barker, 2004; Beinder, 2008; Rhind et al., 2003). Weibliche Nachkommen von Säugetieren wie Rhesusaffe (Dumesic et al., 1997), Schaf (Savabieasfahani et al., 2005; Veiga-Lopez et al., 2008) oder Ratte (Arai et al., 1981) zeigen einen PCOS-ähnlichen Symptomenkomplex, einschließlich der damit häufig verbundenen metabolischen Sekundärveränderungen (Demissie et al., 2008) und Erkrankungen (Hogg et al., 2011), wenn entweder den Muttertieren während der Fetalzeit oder den Neugeborenen postnatal Steroidhormone wie Androgene (Abbott et al., 2002; Veiga-Lopez et al., 2008) oder Östrogene (Chapman et al., 2009) verabreicht wurden. Noch ist unklar, welcher Art genau die Veränderungen sind, die durch die erhöhte Steroidhormonexposition der Muttertiere bzw. Neugeborenen hervorgerufen werden und wie sich diese auf die späteren Lebensabschnitte der Jungtiere auswirken können. Insbesondere werden epigenetische Veränderungen in den Feten und Neugeborenen diskutiert, beispielsweise Einflüsse auf die Ausreifung des hypothalamo-hypophysär-gonadalen Regelkreises (Foecking and Levine, 2005; Foecking et al., 2005) und des Immunsystems (Chapman et al., 2009). Auch eine Beeinflussung der Methylierung von für Metabolismus und Reproduktion relevanter Genabschnitte wird beschrieben (Dumesic et al., 2009; Xu et al., 2011). Dabei können die im mütterlichen und fetalen Organismus während der Fetalzeit sowie im Organismus der Neugeborenen gesetzten Störungen zunächst morphologisch nicht fassbar und nur metabolischer Natur sein, so können sie beispielsweise die Expression von Enzymen des Steroidhormonstoffwechsels im Ovar nachhaltig beeinflussen (Hogg et al., 2010).

Die Synthese von Androgenen, Gestagenen und Östrogenen findet bei Säugetieren in erster Linie im Ovar und in der Nebennierenrinde statt. Das für die Steroidhormonsynthese benötigte Cholesterol wird durch das Protein StAR (Steroidogenic acute regulatory protein) von der äußeren Mitochondrien-Membran an die innere Mitochondrien-Membran transportiert. Die Expression von *Star* wird in den Gonaden maßgeblich durch LH reguliert, wobei LH die Expression von *Star* in den Granulosazellen des Ovars steigert (Kallen, 1998). Die Umwandlung von Cholesterol zu Pregnenolon wird durch die Cholesterin-Monooxygenase (P450<sub>scc</sub>, CYP11A1) in den Gonaden und Nebennieren katalysiert. Das Enzym CYP17A1 (Cytochrom P 450 17A1) katalysiert sowohl als 17 $\alpha$ -Hydroxylase als auch als 17/ 20-Lyase die Umwandlung von Pregnenolon zu Dehydroepiandrosteron (DHEA). Die Synthese von DHEA findet beim Menschen im Wesentlichen in der Nebenniere, aber auch in den

Thekazellen des Ovars statt. Bei Mäusen spielt die Nebenniere für die Synthese von DHEA jedoch eine untergeordnete Rolle (Cutler et al., 1978; Katagiri et al., 1998; Le Goascogne et al., 1991; Vinson et al., 1978; Vianello et al., 1997). Über das Enzym 3 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase (3 $\beta$ -HSD) und das Enzym 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase erfolgt die weitere Verstoffwechselung von DHEA zu Androstendion und Testosteron. In der Granulosazellschicht der ovariellen Follikel erfolgt durch das Enzym Aromatase (CYP19A1) die Synthese der Östrogene.

Im Serum von PCOS-Patientinnen ist DHEA das Steroidhormon mit der höchsten Konzentration (Motta, 2010). Ein vermuteter Zusammenhang zwischen Mutationen im *Cyp11a1*-Gen und dem Auftreten eines PCOS konnte bisher nicht bestätigt werden (Gaasenbeek et al., 2004). Eine schematische Übersicht über die Steroidhormonbiosynthese gibt Abb. 2 wieder.



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der Steroidhormonbiosynthese. Die Hydroxylase CYP17A1 katalysiert als Schlüsselenzym die Hydroxylierung von Pregnenolon und Progesteron bzw. als 17/20- Lyase die Synthese von Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Androstendion (orange Kästchen). (Abbildung in Anlehnung an Häggström and Richfield, 2014).

*Zusammenfassend ist festzustellen, dass sich ein PCOS-ähnlicher Symptomenkomplex einstellen kann, wenn während der Perinatalzeit pathologische Steroidhormonkonzentrationen herrschen.*

### 3.4 Der murine Ovarialzyklus

Anders als beim Menschen dauert der ovarielle Zyklus der Maus nur etwa vier bis sechs Tage (Parkes, 1928; Van Ebbenhorst Tengbergen, 1955). Paarungsverhalten, Hormonstatus und das Äußere des Introitus und Vestibulum vaginae lassen vier Stadien - Proöstrus, Östrus, Metöstrus und Diöstrus - unterscheiden, in deren Abfolge sich die Vaginalschleimhaut zyklisch wandelt. Für jedes Zyklusstadium zeigt der Abstrich der Vaginalschleimhaut ein charakteristisches zelluläres Bild und Färbeverhalten (Goldman et al., 2007); gleichsam ist der histologische Aufbau des Epithels in der Vagina für jede Zyklusphase charakteristisch (Westwood, 2008). So zeigt sich ein mehrschichtiges Epithel mit hellen, muzinösen, hochprismatischen Zellen in der obersten Schicht im Proöstrus, ein hohes, stark verhorntes, mehrschichtiges Plattenepithel im Östrus, ein hohes, von Leukozyten stark durchdrungenes Epithel ohne Verhornungszeichen und mit Schleimrückständen im Metöstrus sowie ein niedriges Epithel, reichlich Zelltrümmer und vor allem Leukozyten im Diöstrus (Li and Davis, 2007; Caligioni, 2009; Goldman et al., 2007). Analog hierzu lassen sich auch für Vaginalabstriche typische Befunde feststellen: Reichlich runde, kernhaltige Zellen aus tieferen Epithelschichten im Proöstrus, reichlich kernlose, zerknitterte oder umgeschlagene große Epithelschollen aus höheren Epithelschichten im Östrus, Zellmaterial aus tieferen und höheren Epithelschichten durchsetzt mit reichlich Leukozyten und Schleimrückständen im Metöstrus, sowie reichlich Zelltrümmer und vor allem Leukozyten im Diöstrus (Caligioni, 2009; Goldman et al., 2007). Proöstrus und Östrus sind die Zyklusphasen der Follikelreifung, welche im wesentlichen von der Stimulation durch Androgene und Östrogene abhängig sind (Barker and Walker, 1966). Der Metöstrus und Diöstrus sind die Zyklusstadien der Gelbkörperphase und werden durch den raschen Anstieg von LH zum Ovulationszeitpunkt ausgelöst.

Die morphologischen Veränderungen der Vaginalschleimhaut und ihrer Zellen ermöglichen es, bei Nagern das Zyklusstadium zuverlässig und grob den Hormonstatus zu bestimmen (Goldman et al., 2007; Li and Davis, 2007). Das histologische Verfahren ist dabei vergleichsweise mindestens so genau wie die Vaginalzytologie und die Bestimmung von Steroidhormonen im Serum, jedoch nur bei getöteten Tieren durchführbar (Gal et al., 2014).

Das Ovar weiblicher Säugetiere zeigt einen charakteristischen anatomischen Aufbau. In der Ovarrinde, dem Cortex ovarii, findet die Follikelrekrutierung und -reifung statt. Die Follikel sind von einer flachen, hormonaktiven Zellschicht, der Theca folliculi, umgeben. Histologisch lassen sich verschiedene Stufen der Follikelreifung unterscheiden – Primordialfollikel, Primärfollikel, Sekundärfollikel, Tertiärfollikel und paräovulatorische (Graaf-) Follikel. Die Follikel sind typischerweise in verschiedenen Reifungsstufen im Ovar nachweisbar. In den Follikeln findet sich die Eizelle, welche von Follikelepithelzellen umgeben ist. Im Verlauf der Reifung bildet sich zwischen Eizelle und Follikelepithel eine Basalmembran-ähnliche Grenzschicht aus, die Zona pellucida, und die

Follikel-epithelzellen reifen zu östrogenbildenden Granulosazellen aus. Im Stadium des Tertiärfollikels bildet sich zwischen Eihügel und Granulosazellschicht ein flüssigkeitsgefüllter Spalt bzw. Höhle, das Antrum folliculi, weswegen Teriärfollikel und Graaf-Follikel auch als antrale Follikel bezeichnet werden (Lippert, 2003). Die Zahl der wachsenden und reifenden Follikel in einem Ovar ist ein wichtiger Indikator für die Follikulogenese, die von systemischen und lokalen Faktoren, wie der Konzentration von Gonadotropinen und der Verfügbarkeit systemischer und lokaler Steroidhormone, beeinflusst wird (Myers et al., 2004). Die wachsenden und reifenden Follikel in einem Ovar durchlaufen zunächst Gonadotropin-unabhängige Prozesse wie Follikelaktivierung und -wachstum, sowie daran anschließende Gonadotropin-abhängige Prozesse wie Follikelrekrutierung und -selektion. Bei der Maus lassen sich die Follikel in einem Ovar anhand ihrer Größe den anfänglichen Wachstums- und den anschließenden Reifungsphasen zuordnen. Follikel von 100 bis 249 µm im Durchmesser sind als Gonadotropin-unabhängig zu betrachten; Follikel von 250 bis 349 µm im Durchmesser gelten als Gonadotropin-abhängige Follikel und Follikel von > 350 µm im Durchmesser gelten als Gonadotropin-abhängige, präovulatorische Follikel (Kagabu and Umezu, 2004).

Nach der Ovulation bildet sich aus den Resten des Graaf-Follikels das Corpus luteum (CL, Gelbkörper) aus, welcher über eine Gestagensynthese der Aufrechterhaltung der Schwangerschaft dient. Kommt es nach der Ovulation nicht zu einer Schwangerschaft, bildet sich aus dem Gelbkörper das Corpus albicans. Die bei Säugetieren nach dem Eisprung aus den rupturierten Follikeln neu hervorgehenden Gelbkörper gelten als ein Maß für die Anzahl der bei dem Eisprung freigesetzten Eizellen, also für die Ovulationsrate (Erb and Wynne-Edwards, 1993; Pallares et al., 2010; Land, 1978).

Reste der Zona pellucida verbleiben über viele Zyklen hinweg im Stroma des Ovars auffindbar, wenn der Follikel sich zurückbildet und atretisch wird, anstatt zum Eisprung zu gelangen. In ihrer Gesamtheit stellen die im Stroma des Ovars gelegenen Zonae pellucidae ein nützliches Maß für die Rückbildung und den Untergang von Follikeln in den vorausgegangenen Ovarialzyklen dar, d.h. für die Atresierate in der Vergangenheit (Myers et al., 2004).

Die Theca folliculi umgibt die Granulosazellschicht der antralen Follikel und lässt sich weiter in die Theca interna und Theca externa differenzieren. In den Thekazellen werden u.a. Androgene synthetisiert, welche in den Granulosazellen zu Östrogenen umgewandelt werden. Die Thekazelldifferenzierung erfolgt zunächst LH-unabhängig, die Androgensynthese in den Thekazellen erfolgt jedoch unter dem Einfluss von LH (Huang et al., 2001). Des Weiteren zeigt sich ein deutlicher Einfluss von IGF-1 auf die interstitielle Thekazell-Differenzierung und die LH-gesteuerte Thekazell-Funktion, wie die Synthese der Androgene. So zeigt sich bei einer erhöhten IGF-1-Konzentration eine Stimulation der Androgensynthese in den Thekazellen (Magoffin and Weitsman, 1994).

*Zusammenfassend finden sich bei Säugetieren zyklische Veränderungen des Reproduktionstrakts, welche durch Gonadotropine und Steroidhormone reguliert werden.*

### 3.5 Der Hedgehog-Signaltransduktionsweg

Der Hedgehog- (Hh-) Signaltransduktionsweg ist ein phylogenetisch alter Signalweg. Das „Igel-artige“ Aussehen von Drosophilalarven, in denen der Signaltransduktionsweg unterbrochen war, gab dem Signaltransduktionsweg den Namen (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980). Die Hh-Signalkaskade als sog. morphogener Stoffwechselweg reguliert übergeordnet die Genexpression in zahlreichen Geweben während der Entwicklung. Sie wirkt sowohl beim spezifischen Aufbau als auch bei der Erlangung gewebetypischer Funktionen mit (Dodge and Lum, 2011). So wurde bereits gezeigt, dass die Hh-Signalkaskade eine entscheidende Rolle für die Vermittlung der Progesteronwirkung in murinen Uteruszellen spielt (Lee et al., 2006). Zudem soll der Hh-Signaltransduktionsweg die Ausbildung von Muskelzellen innerhalb der Thekazellschicht von Ovarien mit beeinflussen (Ren et al., 2009). Auch bei vielen Fehlbildungen, neurologischen Erkrankungen und bei der Entstehung von Tumoren ist sie beteiligt. So ist insbesondere ein Einfluss der Hh-Signalkaskade auf die Tumorphiliferation, Rezidivfreudigkeit und die Resistenzentwicklung gegen Chemotherapeutika beim Medulloblastom (Pomeroy et al., 2002), beim Basalzellkarzinom (Dahmane et al., 1997) und bei gastrointestinalen Neoplasien (Berman et al., 2003) beschrieben worden. Eine gezielte Tumorthherapie durch selektive Hemmung einzelner Proteine des Hh-Signaltransduktionswegs, wie zum Beispiel Smoothened (Smo), wird diskutiert (Peng et al., 2014).

Wie sich ein alleinig defekter Hh-Signaltransduktionsweg in Hepatozyten auswirkt, war bis vor kurzem kaum untersucht. Es bestanden sogar Zweifel, dass der Hh-Signaltransduktionsweg in adulten Hepatozyten überhaupt von Bedeutung ist, da in diesen bislang nicht alle am Signaltransduktionsweg beteiligten Faktoren, wie zum Beispiel die Gli-Faktoren, nachgewiesen werden konnten (Rangwala et al; 2011). Mittlerweile wird ein Einfluss der Hh-Signalkaskade unter anderem auf die Zonierung und den Lipidmetabolismus der Leber angenommen (Matz-Soja et al., 2013).

Insgesamt sind drei Hh-Proteine bekannt (sonic Hh, indian Hh und desert Hh). Als deren Rezeptor an der Membran dienen Patched-1 und Patched-2. Ohne dass Hh-Proteine an einen der beiden membranständigen Rezeptoren binden, wirken diese hemmend auf das Membranprotein Smo ein. Wird Smo nach Hh-Protein-Bindung über die Kaskade aus seiner Hemmung befreit, so aktiviert es die Serin-Threonin-Kinase STK36, welche die Phosphorylierung des Proteins Su(fu) (Supressor of fused) katalysiert. Su(fu) aktiviert darauf mehrere Transkriptionsfaktoren, insbesondere die Zinkfingerproteine Gli 1, Gli 2 und indirekt auch Gli 3.

*Zusammenfassend ist festzustellen, dass der Hh-Signaltransduktionsweg auf Stoffwechselprozesse in der Leber und im Reproduktionstrakt einen Einfluss zu haben scheint.*

### **3.6 Homozygote leberspezifische Morphogen-Knock-out-Mäuse als Tiermodell für leberinduzierte Krankheiten**

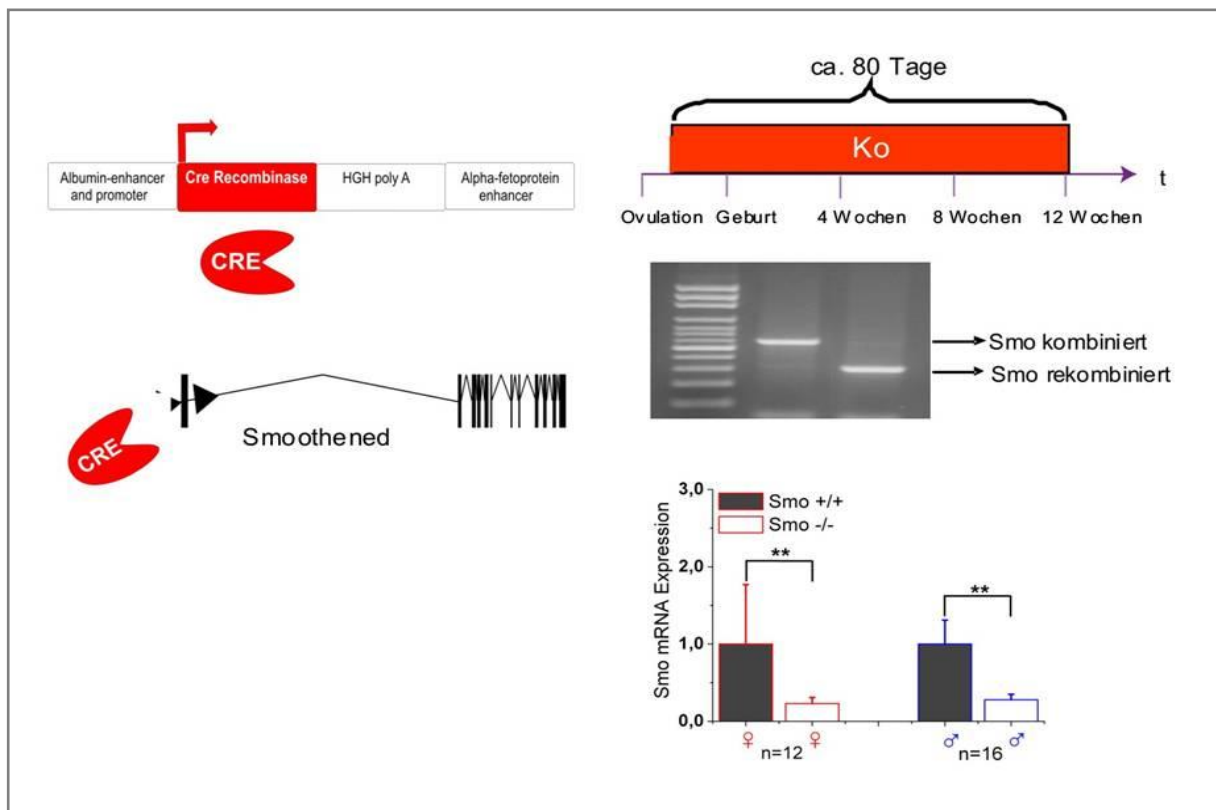
Die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Gebhardt am Institut für Biochemie der Universität Leipzig hat gezeigt, dass der WNT (Wingless-type-Int-1)/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktionsweg - der die embryonale Entwicklung der Leber am distalen Ende des Vorderdarms entscheidend reguliert (Lade and Monga, 2011) - für die zelluläre und subzelluläre Spezialisierung adulter Leberzellen innerhalb klar definierbarer funktioneller Zonen im Leberläppchen bedeutsam ist (Gebhardt et al., 2007; Gebhardt and Hovhannisyanyan, 2010). Der Signaltransduktionsweg moduliert beispielsweise in der adulten Leber den Wechsel vom oxidativen Glukoseabbau zur Vergärung zu Milchsäure (Chafey et al., 2009), das Ausmaß bzw. die Balance der Harnstoff- und Glutamin-Synthese (Burke et al., 2009) sowie den Besitz an Enzymen des Fremdstoffmetabolismus, wie die Cytochrom-P450 (CYP)-Isoenzyme (Braeuning et al., 2011; Loeppen et al., 2005).

Da der WNT/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktionsweg in der Embryonalentwicklung und bei der Karzinogenese eng mit dem Hh-Signaltransduktionsweg zusammenwirkt (Jacob et al., 2011), liegt die Vermutung nahe, dass dies bei der Regulation von Stoffwechselvorgängen im voll entwickelten adulten Organ ebenfalls der Fall sein könnte (Matz-Soja et al., 2013).

Um den Einfluss des Hh-Signaltransduktionswegs auf die Funktionen der Leber zu charakterisieren, wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Gebhardt eine transgene Mauslinie generiert (SAC-Mäuse = *Smo*-Alb/AFP-Cre), bei der *Smo* Hepatozyten-spezifisch kurz nach der Entwicklung der Leber zu dem Zeitpunkt inaktiviert wird (sog. Knock-out; KO), wenn es etwa am 8. – 9,5. Embryonaltag in den Hepatozyten zur Bildung von alpha-Fetoprotein (AFP) bzw. Albumin (Alb) kommt (Abb. 3; Kellendonk et al., 2000; Vorachek et al., 2000). Eine Aktivierung der Cre-Rekombinase im Ovar wurde im Vorfeld durch Expressionsmessungen von *Smo* im ovariellen Gewebe ausgeschlossen. In der Folge entwickelt sich in den Mäusen ein Leberschaden, der systemisch zu Veränderungen im Blutzucker-, Fett- und Hormonhaushalt führt (Matz-Soja et al., 2014). Unerwarteterweise zeigten weibliche transgene Tiere eine Infertilität. So wurden bei der Verpaarung der weiblichen homozygoten *Smo*-KO-Mäuse keine Würfe erhalten.

Im Jahr 2013 kommentierten Pruniau et al. eine Studie, in welcher Mäuse mit dem AFP-Cre-Konstrukt verwendet wurden, um Auswirkungen von spezifisch intrahepatisch ausgeschalteten STAT-Molekülen zu studieren (Pruniau et al., 2013; Mueller et al., 2011). Die in diesem Kommentar von den Autoren geäußerten Bedenken gründeten auf der Tatsache, dass im AFP-Cre-Konstrukt die Kodiersequenz und die Polyadenylierungssequenz für humanes Wachstumshormon (engl. human growth hormone, hGH) mit eingebaut sind. Dies führt dazu, dass bei der AFP-/Albumin-induzierten Transkription des Konstruktes ein polycystronisches Cre-hGH-Transkript entsteht, und zwar in der Leber sowie im

hypothalamo-hypophysären System. In der Folge komme es gemäß Pruneau et al. zu einer exorbitanten Bildung von hGH im hypothalamo-hypophysären System der Mäuse, welches die körpereigene, murine Wachstumshormonsynthese dann vollständig unterdrücken würde. Die betroffenen Mäuse zeigen dann eine signifikant reduzierte Körpermasse, eine Leberzellverfettung bei Hochregulation verschiedener Gene des Lipid- und IGF-1-Stoffwechsels sowie eine Hypoplasie der Hypophyse, also größtenteils Befunde, welche auch bei den hier verwendeten, homozygoten *Smo*-KO-Mäusen zu erheben sind.



**Abb. 3:** Durch gentechnische Veränderungen wird in *Smo*-KO-Mäusen in der Leber das *Smo* stillgelegt, sobald es in diesem Organ embryonal zur Synthese des leberspezifischen AFP bzw. Albumins kommt. Der in der vorliegenden Arbeit dargelegte, postnatale Phänotyp entwickelt sich etwa 3 Monate nach der Stilllegung des Signaltransduktionswegs in den weiblichen Mäusen postnatal. PCR-Amplifikat der rekombinierten *Smo*-Allele (350 Basenpaare) im Vergleich zu den kombinierten WT-Allelen (600 Basenpaare) von *Smo* (PCR-Banden rechts). Signifikant verminderte *Smo*-Expression in der Leber der KO-Tiere (Box plots). (Abbildung erhalten mit freundlicher Genehmigung von Frau Matz-Soja aus Matz-Soja et al., 2014)

*Zusammenfassend ist festzustellen, dass bei weiblichen Mäusen mit embryonal inaktiviertem Smo-Gen in der Leber eine Infertilität im geschlechtsreifen Alter auftritt.*



#### 4. AUFGABENSTELLUNG UND ZIELSETZUNG

In dem Hepatozyten-spezifischen *Smo*-KO-Mausmodell wird ein wichtiges Transduktorprotein des Hh-Signaltransduktionswegs konditionell ausgeschaltet, wenn es in den Hepatozyten zur Bildung von AFP bzw. Albumin kommt. Die Mäuse entwickeln pränatal einen Leberschaden im Sinne einer Leberverfettung, der mit zunehmendem Alter der Tiere an Schwere zunimmt. Begleitend erzeugen weibliche, homozygote *Smo*-KO-Tiere nach der Verpaarung keine Nachkommen. Die männlichen homozygoten oder heterozygoten *Smo*-KO-Tiere erweisen sich indes als fertil.

Daraus ergaben sich folgende Fragestellungen für die vorliegende Arbeit:

*Erstens:* Lassen sich morphologische Veränderungen (Veränderungen des zyklischen Aufbaus, strukturelle Veränderungen, Veränderungen der Follikelzahl, Veränderungen der Gelbkörperzahlen) im Ovar und der Vagina der weiblichen *Smo*-KO-Mäuse auffinden, die die herabgesetzte Fertilität erklären könnten?

*Zweitens:* Lassen sich die erhobenen morphologischen Befunde mit Veränderungen von einschlägigen physiologischen, biochemischen und metabolischen Parametern in Einklang bringen. Hierbei sollte auf die parallel dazu in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Matz-Soja in der Biochemie erhobenen Befunde, dass sich die Expression von Genen des Steroidmetabolismus ändert, aufgebaut werden.

*Drittens:* Um einen wie von Pruniau et al. beschriebenen Einfluss des AFP-Cre-Konstruktes auf die Fertilität der *Smo*-KO-Mäuse auszuschließen, erfolgten im Anschluss an den experimentellen Teil dieser Arbeit zusätzliche Untersuchungen an heterozygoten, weiblichen *Smo*-Mäusen. Die gemischt heterozygoten *Smo*-Mäuse exprimieren Cre-Rekombinase in gleicher Weise wie die in der vorliegenden Arbeit verwendeten, homozygoten *Smo*-KO-Mäuse. Sie unterscheiden sich aber von diesen durch eine mehr oder weniger große Restaktivität von *Smo*.

Dabei lautete die Arbeitshypothese wie folgt: Sollten die in der Arbeit erhobenen Befunde bei den homozygoten *Smo*-KO-Mäusen Folge der von Pruniau et al. beschriebenen Einflussnahme des AFP-Cre-Konstruktes auf das hypothalamo-hypophysäre-System sein, so wären bei den heterozygoten, weiblichen *Smo*-Mäusen die gleichen Befunde in annähernd gleicher Stärke zu erheben wie bei den homozygoten *Smo*-KO-Mäusen. Sollten die Befunde jedoch in Gänze oder zumindest anteilig auf dem herbeigeführten *Smo*-Mangel beruhen, so wären bei den phänotypisch milder *Smo*-geminderten, heterozygoten Tieren diskretere Befunde zu erwarten, als bei den stärker *Smo*-geminderten,

heterozygoten Tieren. In diesem Fall wäre eine Korrelation zwischen den Gelbkörperzahlen in den Ovarien und den Smo-Restaktivitäten zu erwarten.

Die Arbeit sollte so insgesamt einen Beitrag leisten, die Zusammenhänge zwischen einer primär veränderten Leberfunktion und einer sich daraus entwickelnden weiblichen Infertilität besser zu verstehen.

## 5. MATERIALIEN UND METHODEN

### 5.1 Mauslinie, -haltung, -tötung und -präparation

Für die Studie wurden durch Frau Dr. Matz-Soja aus der Arbeitsgruppe Prof. Gebhardt des Instituts für Biochemie der Universität Leipzig insgesamt 24 weibliche *Smo*-KO-Mäuse und 27 weibliche Wildtyp- (WT-)-Mäuse für die Untersuchungen ausgewählt. Die verwendeten Mäuse wurden unter Standardbedingungen (freier Zugang zu Wasser und Trockenfutter, 12 Stunden Tag- (06:00 - 18.00 Uhr)/ Nachtrhythmus (18.00 - 06.00 Uhr), 21 - 23 °C Raumtemperatur) im Medizinisch-Experimentellen-Zentrum der Universität Leipzig herangezüchtet und gehalten. Vor der Tötung wurde den Tieren für 24 Stunden das Futter entzogen und anschließend für 12 Stunden erneut offeriert, um Schwankungen in den Leber- und Stoffwechselwerten, bedingt durch Unterschiede in der unmittelbaren Futteraufnahme, gering zu halten. Die Mäuse wurden schließlich mit einem Gemisch aus Ketamin, Atropin und Rombun anästhesiert, gewogen und kardial mit einer Spritze bei eröffnetem Thorax entblutet. Anschließend wurde ihre Bauchhöhle eröffnet, Organe des Interesses (Vagina, Ovar mit Eileiter und Leber) wurden entnommen und in 4 %-iges, gepuffertes Paraformaldehyd bzw. flüssigen Stickstoff überführt. Das gewonnene Herzblut wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur koagulierte, zu Serum verarbeitet (Zentrifugation mit 8000 g, 10 min) und bei -80 °C eingefroren. In einzelnen Fällen wurde zudem die Nebenniere für eine orientierende makroskopische und histologische Beurteilung entnommen – hierbei zeigten sich keine pathologischen Veränderungen.

Bei sämtlichen Tieren erfolgte eine Zuordnung des Zyklusstadiums über die Vaginalhistologie, exemplarisch bei einzelnen Tieren zudem über die Vaginalzytologie. Da die Unversehrtheit der Ovarien nach Entnahme (vollständige Entnahme mit intakter Serosa und intaktem Gefäßhilus) für die morphologische Analyse entscheidend war, wurde jeweils das linke Ovar von insgesamt fünf *Smo*-KO-Mäusen und zehn WT-Mäusen im Alter von 12 Wochen post partum untersucht, also nach dem physiologischen Eintreten der Geschlechtsreife im Alter von 6-8 Wochen (MacLennan et al., 2011). Für die Expressionsmessungen in der Leber wurden je 7 *Smo*-KO- und WT- Mäuse verwendet, für die Expressionsmessungen im Ovar 11 *Smo*-KO-Mäuse und 8 WT-Mäuse. Die Steroidhormonmessungen im Serum erfolgten an je 9 *Smo*-KO- und WT-Mäusen. Die Konzentration von IGF-1 und IGFBP-1 wurde im Serum von jeweils 24 Tieren bestimmt. Für die jeweilige Untersuchung war die Zahl der untersuchten Tiere abhängig von der Verfügbarkeit des Gewebes bzw. des Serums. Eine Aktivierung der Cre-Rekombinase im Ovar wurde im Vorfeld durch Frau Dr. Matz-Soja molekularbiologisch ausgeschlossen.

Zusätzlich wurden fünf heterozygote, weibliche *Smo*-Mäuse aus gleichen Zuchtbedingungen untersucht. Den Tieren wurden analog zum Vorgehen bei den *Smo*-KO- und WT-Mäusen Serum, die Leber, die Ovarien sowie die inneren Geschlechtsorgane entnommen und aufgearbeitet.

Für die aufgeführten Arbeiten lag eine Genehmigung der Tierschutzbehörde des Landes Sachsen vor.

## **5.2 Aufarbeitung des Materials für die Lichtmikroskopie**

### **5.2.1 Paraffineinbettung und Präparateherstellung**

Die in 4 % gepuffertem Paraformaldehyd fixierten Ovarien und Vaginen wurden im Institut für Anatomie der Universität Leipzig in fließendem Wasser gewässert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe bis ins Xylol entwässert (3 min. Ethanol 30%, 3 min. Ethanol 50 %, 3 min. Ethanol 80 %, 3 min. Ethanol 96 %, 5 min. Xylol) und in Paraffinblöcken eingebettet.

Die Blöcke wurden mit einem Mikrotom (ThermoScientific HM 430, Waltham, USA) zu 8 µm dünnen Schnittpräparaten planparallel zur ihrer Längsseite aufgearbeitet und auf SuperFrost®Plus-Objekträger (Menzel GmbH, Braunschweig) aufgezogen. Die Schnitte wurden in Xylol entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe ins wässrige Milieu überführt (analog zu oben in umgekehrter Abfolge) und histologisch gefärbt. Anschließend wurden die gefärbten Präparate unter einem Lichtmikroskop (Zeiss Axioplan 2, Jena) durch zwei Untersucher unabhängig befundet, mit Hilfe eines Messokulars vermessen und mit einer digitalen Kamera (ProgRes C3 Jenoptik, Jena) und einer Bildaufnahmesoftware (ProgRes® CapturePro V.2.8.8 Jenoptik, Jena) fotografisch festgehalten.

### **5.2.2 Histologische Färbungen**

#### *Hämatoxylin-Eosin- (HE-) Färbung*

Entparaffinierte Schnitte wurden für 10 min in Hämalaulösung nach Mayer (Roth, Karlsruhe) gestellt, unter fließendem Wasser differenziert und für 1 min in 1 %ige Eosinlösung (Roth, Karlsruhe) verbracht. Nach kurzer Spülung mit Aqua dest. wurden die Schnitte daraufhin über eine aufsteigende Alkoholreihe in Xylol überführt (siehe Kapitel 5.2.1) und mit Histokitt (Roth, Karlsruhe) eingedeckt.

#### *Perjodsäure-Schiff-Färbung (engl. periodic acid Schiff, PAS)*

Entparaffinierte Schnitte wurden für 10 min in 0,5 % Perjodsäure und nach kurzem Spülen mit Aqua dest. für 15 min in Schiff-Reagenz (Roth, Karlsruhe) gestellt. Danach wurden die Schnitte 3 mal für je 5 Minuten in SO<sub>2</sub>-Wasser (6 ml Kaliumdisulfit 5 ml 1N HCl, 100 ml Aqua dest.) gespült, gewässert, mit Hämalaulösung nach Mayer gegengefärbt und in Histokitt über eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol (siehe Kapitel 5.2.1) eingedeckt.

### **5.3 Bestimmung der Zyklusphase mittels Vaginalzytologie und -histologie**

In der vorgelegten Arbeit wurde das Zyklusstadium der Mäuse über die Vaginalhistologie bestimmt. Um dennoch einen direkten Vergleich zwischen Vaginalzytologie und Vaginalhistologie zu bekommen, wurde von einzelnen Mäusen vor der Tötung ein Vaginalabstrich abgenommen und verblindet zu der Histologie in den Schnittpräparaten der Vaginen befundet. Auf wiederholte Vaginalabstriche, um den Zyklusverlauf vor der Tötung festzustellen, wurde allerdings bewusst verzichtet, da dies möglicherweise eine Irritation der Vaginalschleimhaut durch das wiederholte Einbringen des Abstrichtupfers mit sich gebracht oder eine Scheinschwangerschaft ausgelöst hätte.

#### **5.3.1 Anfertigung und Auswertung der Vaginalabstriche**

Oberflächliche Schleimhautzellen wurden mit einer Abstrichöse ( $\varnothing$  1,5 mm) gewonnen, in einen Tropfen Aqua dest. auf einen Objektträger verteilt, angetrocknet und für 15 - 20 min nach Giemsa/Papanicolau (Kernfärbung mit Hämatoxylin, Zytoplasmafärbung mit einem Gemisch aus Orange G6 und Polychromfarbstoff) gefärbt.

#### **5.3.2 Anfertigung und Auswertung der Vaginalschnittpräparate**

Ausgewertet wurden 8  $\mu$ m dünne HE-Schnittpräparate der Vaginen. Mitosefiguren waren spärlich und dann häufig im Di- und Proöstrus zu finden, während Leukozyten besonders im Metöstrus und - in geringerem Maße - im Diöstrus auffielen. Die auf diese Weise festgestellten Stadien des Vaginalepithels dienten als Zuordnungskriterium der Ovarien zu einem bestimmten Zyklusstadium.

### **5.4 Morphologische Analyse der Ovarfunktion**

#### **5.4.1 Auswahl der Ovarien**

Da sich das histomorphologische Bild in den Ovarien wie auch in den anderen weiblichen Reproduktionsorganen zyklusabhängig ändert, erschien es angesichts der raschen Abfolge der Stadien und ihres Ineinandergreifens sinnvoll, diese bei der zyklusbezogenen Betrachtung in Ovarien der Follikelphase (Proöstrus und Östrus) und in Ovarien der Gelbkörperphase (Metöstrus und Diöstrus) entsprechend zusammen zu fassen. Da der Zyklus der *Smo*-KO-Weibchen monophasisch und die Abstriche bzw. die Histologie der Vaginen nahezu gleichbleibend waren, konnte eine Zuordnung der Ovarbefunde zu den Zyklusphasen anhand des Vaginalstatus letztendlich nur bei den WT-Kontrollmäusen erfolgen. In der Folge wurde pro Zyklusstadium jeweils bei fünf Tieren das linke Ovar ganz aufgearbeitet, um mögliche, noch so geringfügige seitenbedingte Unterschiede in der

Ovulationsrate der Ovarien der linken und rechten Körperhälfte zu eliminieren (Wiebold and Becker, 1987).

#### **5.4.2 Aufarbeitung der Ovarien**

Die morphologische Analyse der Ovaritätigkeit erfolgte jeweils am linken Ovar. Hierzu wurde dieses komplett in Serie mit einer Schnittdicke von 8 µm geschnitten. Die entstehenden Schnitte wurden auf 3 Serien von Objektträgern aufgeteilt, sodass jeder dritte Schnitt einer bestimmten Schnittserie zugehörig wurde und die Organgegebenheiten im Abstand von 24 µm zum Vor- und Folgeschnitt darlegte. Die erste Schnittserie wurde mit HE gefärbt, die zweite mit PAS und die dritte für eventuelle Spezialuntersuchungen aufgespart. Die mittels HE gefärbten Schnitte dienten der quantitativen und qualitativen Follikel- und Gelbkörper- Auswertung sowie der Vermessung der interstitiellen Zellen, während die PAS-gefärbten Schnitte der Quantifizierung der im ovariellen Stroma befindlichen, kollabierten Zonae pellucidae dienten.

#### **5.4.3 Ermittlung der maximalen Längsschnittfläche**

In der HE-gefärbten Schnittserie wurde anhand seines größten Längs- und Querdurchmessers mit Kreuzungspunkt in der Schnittmitte der Schnitt mit der größten Flächenausdehnung bestimmt und zusammen mit den zwei Schnitten davor und danach vermessen. Aus den beiden ermittelten und im Anschluss gemittelten Durchmessern wurde der Flächeninhalt des näherungsweise elliptischen Gewebeschnittes errechnet. Um einen systematischen Fehler aufgrund der ebenfalls signifikant geringeren Körpermasse der *Smo*-KO-Mäuse zu vermeiden, wurde die Ovarfläche in Relation zur Körpermasse betrachtet. Diese Größe diente als Anhaltspunkt für die wahre Größe der Ovarien (Jonard et al., 2005).

#### **5.4.4 Auszählung und Beurteilung der Follikel in Entwicklung**

Der Follikeldurchmesser wurde mit Hilfe eines Messokulars bestimmt und als der Mittelwert des kleinsten und größten Durchmessers des Follikels mit Kreuzungspunkt in der Follikelmitte definiert.

Die Beurteilung des Gesundheitsgrades der Follikel erfolgte anhand der Kriterien (Lara et al., 2000; Oakberg, 1979; Osman, 1985):

*Erstens:* Form und Beschaffenheit der Eizelle (rund vs. unförmig), des Eizellkerns (intakt vs. fragmentiert) und der Zona pellucida (regelmäßig strukturiert und rund vs. verquollen und deformiert).

*Zweitens:* Anteil apoptotischer Körperchen in der Membrana granulosa ( $\leq 5\%$  vs.  $> 5\%$  der Gesamtzellzahl in der Membrana granulosa).

*Drittens:* Dicke und Schichtung der Membrana granulosa (gleichmäßig geschichtet vs. niedrig bzw. ungleichmäßig geschichtet, eventuell auch zystisch verändert).

*Viertens*: falls vorliegend, anhand des Aufbaus der Theka folliculi (zirkulär angeordnet, fibroblastisch, epitheloid vs. aus rundlich aufgetriebenen, klarzellig anmutenden Zellen bestehend).

Zur Auswertung kam jeder HE-gefärbte Schnitt, d.h. alle Schnitte eines Ovars im Abstand von 24 µm. Es wurden jeweils nur die Follikel in einem Schnitt berücksichtigt, deren Eizellkerne mit angeschnitten waren. Da der Durchmesser des murinen Eizellkerns in der Regel 24 µm nicht überschreitet (Spaniel-Borowski et al., 1983; Szollosi et al., 1990) wurden so Doppelzählungen vermieden.

#### **5.4.5 Auszählung der Zonae pellucidae im ovariellen Stroma**

In PAS-gefärbten Ovarschnitten sind die glykoproteinreichen Zona pellucidae als kräftig magentarot leuchtende Strukturen im Stroma leicht zu finden. Um ein repräsentatives Verhältnis der im Stroma freiliegenden Zonae pellucidae zu erhalten und um Doppelzählungen zu vermeiden, erfolgte die Zählung in jedem 18. aufeinanderfolgenden, 8 µm dicken, PAS-gefärbten Ovarschnitt, d.h. in einem Abstand von 144 µm zueinander.

#### **5.4.6 Auszählung der Gelbkörper**

Um einen Eindruck über die Ovulationsrate zu erhalten, wurden die Gelbkörper parallel zu den Follikeln in den HE-gefärbten Schnitten gezählt. Als Orientierungshilfe für die Wiedererkennung bereits gezählter – und damit nicht mehr zu erfassender – Gelbkörper diente die topographische Lage des Gelbkörpers im Ovar, die Art und Menge seiner Gefäße, die Größe seiner Lutealzellen sowie das eventuelle Vorliegen einer Gelbkörperhöhle oder einer Einblutung.

Auf eine Einteilung der vorgefundenen Gelbkörper in frische, reife und alte, sich zurückbildende oder zurückgebildete Gelbkörper wurde aufgrund der eindeutigen Befundlage bei den *Smo*-KO-Mäusen in der Folge verzichtet.

#### **5.4.7 Bestimmung von Stromazelldichte und -größe**

Der zelluläre Aufbau des Ovarialstromas wurde in je fünf Ovarien der *Smo*-KO-Mäuse und WT-Kontrolltiere quantitativ erfasst, indem in jeweils fünf 8 µm dicken HE-Schnitten die Stromazellen anhand ihrer Zellkerne in repräsentativen Arealen gezählt wurden. Um gewebebedingte Fehler bei der Zählung zu vermeiden, wurden gezielt Bereiche mit wenig und damit vernachlässigbaren Gefäßanschnitten und/oder Schnittartefakten ausgewählt. Die ausgewählten Stromaareale wurden in 40-facher Vergrößerung zunächst digital fotografiert (ProgRes® CapturePro V.2.8.8 Jenoptik, Jena). In Folge wurden in einem jeweils gleich definierten Bildausschnitt, der 25 % der Gesamtbildfläche der digitalen Aufnahme betrug, die Zellkerne der Stromazellen manuell mithilfe einer Software (ImageJ 1.48v, NIH, USA) am Bildschirm gezählt.

## 5.5 Isolierung von murinen Hepatozyten

Für die Hepatozyten-Isolation wurden die Lebern durch Frau Dr. Matz-Soja mit Kollagenase perfundiert und die herausgespülten Zellen über mehrere Zentrifugationsschritte entlang ihres Dichtegradienten in Hepatozyten und übrige Zellen getrennt (Gebhardt, 1998). Die isolierten Hepatozyten wurden anschließend in Williams Medium E (TPP, Trasadingen) aufgenommen, das mit 10 %igem fetalem Kälberserum, 2 mM Glutamin und  $10^{-4}$  mM Dexamethason angereichert und mit Antibiotika (Penicillin 50 U/ml, Streptomycin 50 µg/ml) versetzt war. Die Zellsuspension wurde auf Kollagen-vorbeschichtete Multiwell-Platten (TPP, Trasadingen) ausgesät. Nach 2 Stunden wurden die Kulturen gewaschen und das Medium durch serumfreies Medium ersetzt. Alsdann wurde die Kultivierung in einem Inkubator (Heracell, Osterode) mit 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 7 % CO<sub>2</sub> Anteil fortgesetzt.

## 5.6 Expressionsmessung von Proteinen der Steroidbiosynthese in der Leber und im Ovar

Die Genexpression der Proteine der Steroidbiosynthese 17/ 20-Lyase bzw. 17-alpha-Hydroxylase (CYP17A1), Cholesterin-Monooxygenase (CYP11A1), Aromatase (CYP19A1), 3β-Hydroxysteroid-dehydrogenase (3β-HSD) und Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) wurde parallel zur morphologischen Analyse der Ovaritätigkeit in den isolierten Hepatozyten und in den Ovarien der *Smo*-KO-Mäuse sowie der WT-Kontrolltiere auf mRNA- Ebene, mittels quantitativer Real-time-polymerase-chain-reaction (qRTPCR), in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Matz-Soja quantifiziert.

Aus den tiefgefrorenen Organproben wurde die RNA unter Verwendung von TriFast-Lösung (Peqlab, Erlangen) gemäß Herstellervorgaben isoliert. Sodann wurde jeweils 1 µg der RNA mit Oligo-dt Primern und dem ProtoScript M-MuLV Taq RT-PCR Kit (New England Biolabs, Frankfurt) in cDNA umgeschrieben und als Vorlage für die qRTPCR verwendet. Die so erhaltene cDNA wurde im Anschluss so verdünnt, dass ihre Konzentration im linearen Bereich der qRTPCR liegt ( $1 \times 10^9 - 1 \times 10^3$  Moleküle). Diese Verdünnung erfolgte 1:10 mit Nuklease-freiem Wasser. Die PCR-Reaktion erfolgte unter Verwendung des LightCycler FastStart DNA Master<sup>plus</sup> SYBR Green I – Kit (Roche Applied Sciences, Mannheim), wobei die für jedes Primerpaar im Vorfeld spezifisch ermittelte Annealing-Temperatur angewendet wurde (Matz-Soja et al., 2013).

Zur Erfolgskontrolle erfolgte im Anschluss an die PCR-Reaktion eine Schmelzkurvenanalyse mit Anlegen eines Temperaturgradienten. Da jedes Amplifikat in Abhängigkeit von seiner Länge und seinem Cytosin/Guanin-Gehalt einen spezifischen Schmelzpunkt aufweist, konnte es so von unspezifischen PCR-Produkten unterschieden werden.



Jede PCR-Probe wurde in dreifacher Ausführung gemessen, von den erhaltenen Werten die arithmetischen Mittel gebildet und die Messwerte auf die Expression des Housekeeping-Gens *beta-Aktin* normalisiert. Die verwendeten Primer (Tab. 2) wurden wahlweise mit der Software ProbeFinder (Universal Probe Library Assay Design Center, Roche Applied Science, Mannheim) bzw. Primer 3 (von Steve Rozen and Helen J. Skaletsky ; 2000) entworfen.

Gen	Primer
<b><i>beta-Aktin</i></b>	forward catccgtaaagacctctatgccaac reverse atggagccaccgatccaca
<b><i>Cyp17a1</i></b>	forward catcccacacaaggctaaca reverse cagtgccccagagattgatga
<b><i>Cyp11a1</i></b>	forward caataaagctgatgagtacaccc reverse gtgcatctcataaagggtcca
<b><i>Cyp19a1</i></b>	forward gagagttcatgagagtctggatca reverse catggaacatgcttgaggact
<b><i>3β-Hsd</i></b>	forward tggacaaagtattccgaccag reverse aggcctccaatagggtctg
<b><i>Star</i></b>	forward ttgggcatactcaacaacca reverse acttcgtccccggtctcc

**Tab. 2:** Verwendete Primer bei der qRTPCR (bereitgestellt von Frau Dr. Matz-Soja)

## 5.7 Ermittlung des Steroidhormon- und des IGF-1-Spiegels im Serum

Um hormonelle Unterschiede zwischen *Smo*-KO-Mäusen und WT-Kontrolltieren im Zusammenhang mit der Fertilitätsstörung der *Smo*-KO-Tiere abzuklären, wurde parallel zu dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe Prof. Gebhardt der Spiegel von Steroidhormonen und Proteinen des komplexen IGF-1 Systems (IGF-1, IGFBP-1) im Serum der Tiere bestimmt. Die Hormonbestimmungen führte Frau PD Dr. Ceglarek und die Bestimmung des IGF-1 und IGFBP-1 im Serum führte Herr Prof. Dr. Kratzsch vom Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik des Universitätsklinikums Leipzig aus (Matz-Soja et al., 2014). Die Hormonmessungen erfolgten im Serum aus dem entnommenen Herzblut der Tiere.

## 5.8 Statistische Auswertung

Numerische Daten wurden mit der Software MS Excel 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, USA), nachgerüstet für Kastengraphiken (Box-Whisker-Plot), analysiert und ausgewertet. Sich ergebende Unterschiede wurden mit dem parameterfreien Mann-Whitney-U-Test unter Verwendung der Software Sigma Stat (Systat, Erkrath) auf Signifikanz untersucht. Lag die Überschreitungswahrscheinlichkeit (p-Wert) unter 0,05 wurden die Unterschiede als real unterschiedlich und somit signifikant angesehen. Die Bereiche, in welchen der jeweilige p-Wert lag, sind in den Graphiken wie folgt angegeben: ein Stern bei  $0.01 \leq \text{p-Wert} < 0.05$ ; zwei Sterne bei  $0.001 \leq \text{p-Wert} < 0.01$ ; drei Sterne bei  $\text{p-Wert} < 0,001$ . Die Darstellung der numerischen Daten geschieht als Säulendiagramm oder Kastengraphik. In dieser umfasst der Kasten die 2. und 3. Quartile, während die Enden den größten bzw. kleinsten Datenwert repräsentieren, abgesehen von den ebenfalls angezeigten Ausreißern.

## 6. ERGEBNISSE

### 6.1 Zuchtverhalten der *Smo*-KO Mäuse

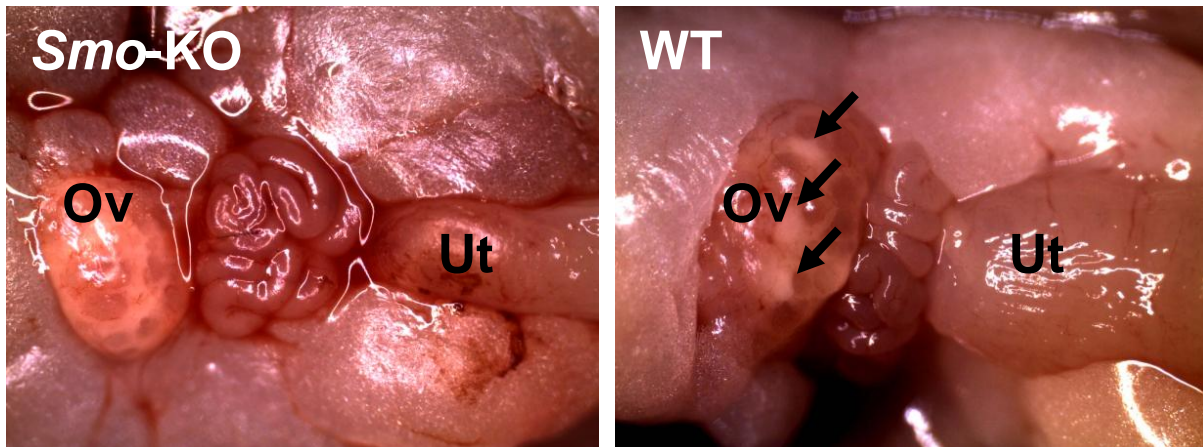
Die *Smo*-KO-Mäuse beiderlei Geschlechts sind kleiner und haben ein signifikant verringertes Körpergewicht, sie sind im Mittel etwa 2,9 g (20,97 g versus 23,87 g) leichter als ihre weiblichen und männlichen WT-Kontrolltiere ohne Gendefekt ( $p < 0,05$ ). Die Mäuse verhalten sich in den ersten 12 Lebenswochen artgerecht.

Die im Vorfeld der Studie bereits festgestellte Infertilität der homozygoten, weiblichen *Smo*-KO-Mäuse bestätigte sich, demgegenüber ließen sich die homozygoten, männlichen *Smo*-KO-Tiere in der Zucht erfolgreich einsetzen.

### 6.2 Makroskopie der inneren weiblichen Geschlechtsorgane

Bereits makroskopisch ist bei den *Smo*-KO-Mäusen eine gestörte Ovarfunktion zu vermuten. Ihre Ovarien erscheinen kleiner als die der WT-Kontrolltiere. Die Ovaroberfläche erscheint weißlich trübe. Bläschenfollikel (mit einer Follikelhöhle, auch antraler Follikel oder Tertiärfollikel) buckeln sich vor, aber es sind keine unter dem Oberflächenepithel liegenden Gelbkörper zu sehen (Abb. 4). Die in topographischer Nähe liegenden Reproduktionsorgane (Eileiter, Uterus, Vagina) wirken juvenil. Das umgebende Fettgewebe ist optisch stark vermehrt.

Die Ovarien der WT-Kontrollmäuse zeigen im Gegensatz zu den Ovarien der KO-Tiere einen Normalbefund (siehe Kapitel 3.4) mit erkennbaren Gelbkörpern unter dem Oberflächenepithel; der Reproduktionstrakt ist dem Alter der Tiere entsprechend entwickelt. Das umliegende Fettgewebe ist unauffällig.



**Abb. 4:** Exemplarische in-situ-Ansichten mit (teilweise von Fettgewebe befreiten) inneren Geschlechtsorganen. Auffallend weißliches Ovar (Ov) der *Smo*-KO-Maus mit Bläschenfollikeln, jedoch ohne erkennbare Gelbkörper. Unauffälliger Normalbefund beim WT-Kontrolltier mit Bläschenfollikeln und Gelbkörpern (Pfeile). Deutlich hypotropher Uterus (Ut) der *Smo*-KO-Maus im Vergleich zum WT-Kontrolltier.

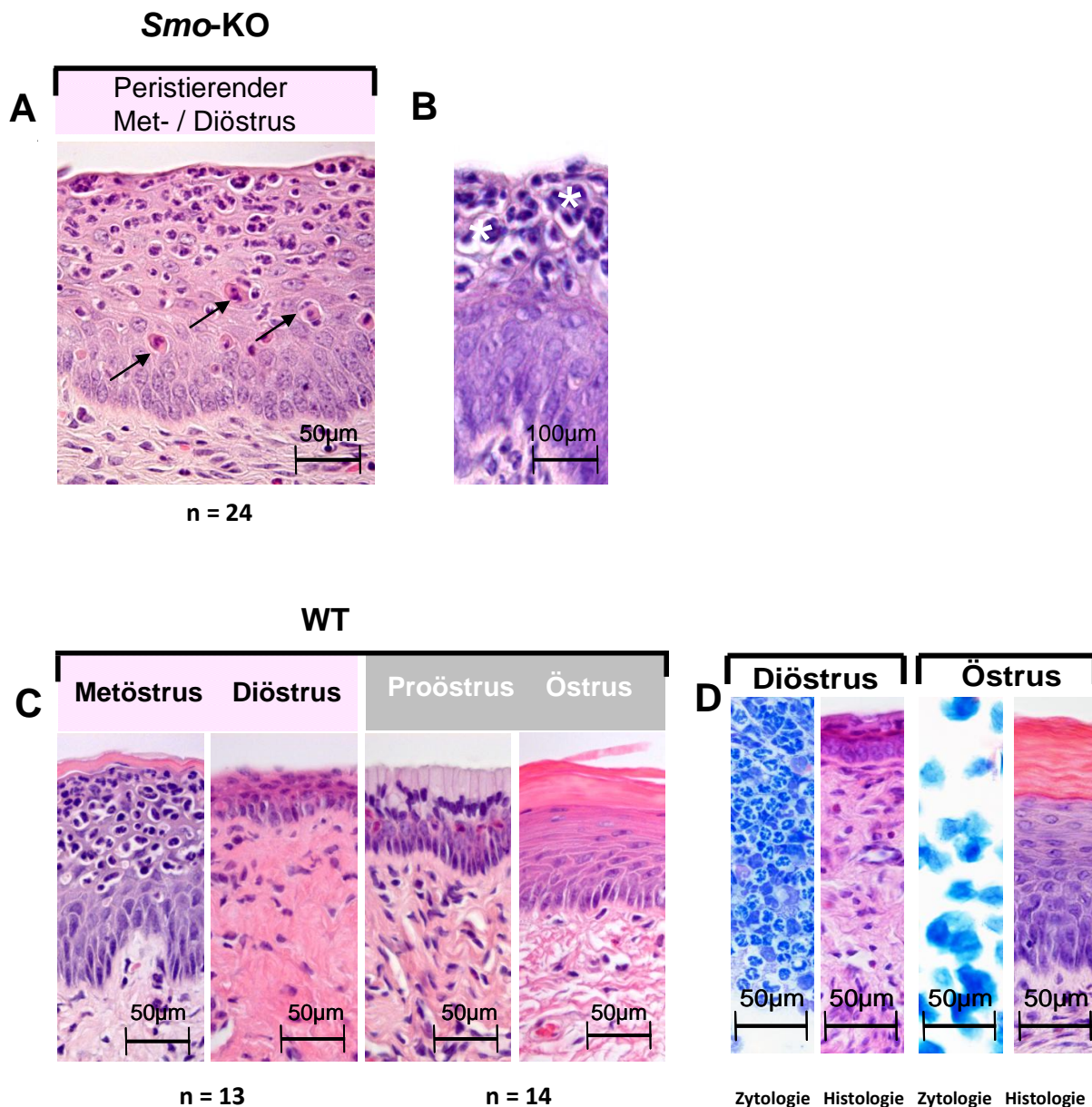
### 6.3 Vaginalzytologie und -morphologie

Zyklische Veränderungen des Vaginalepithels finden sich bei den *Smo*-KO-Mäusen nicht, ihr Schleimhautepithel ist einheitlich aufgebaut (Abb. 5 A). Zu sehen ist ein mehrschichtiges, nicht verhorntes Plattenepithel, dass von der Lamina propria aus stark von Entzündungszellen durchsetzt wird. In den oberen Epithelschichten sammeln sich die Entzündungszellen an und liegen teilweise in stark erweiterten Zellzwischenräumen vor (Abb. 5 B). Die Entzündungszellen setzen sich in erster Linie aus neutrophilen und eosinophilen Granulozyten zusammen.

Das vorgefundene histomorphologische Bild gleicht am ehesten einer Vaginalschleimhaut in den Tagen direkt nach dem Eisprung, d.h. es lässt sich als persistierender „Met-/Diöstrus“ deuten. Bei sieben der untersuchten 24 *Smo*-KO-Mäuse ist das Epithel vergleichsweise niedriger als bei den anderen Tieren und deshalb noch eher einem „persistierenden Diöstrus“ entsprechend. Aufgrund des einheitlichen Bildes eines „Met-/Diöstrus“ der Vaginalschleimhaut der *Smo*-KO-Mäuse, wurden für eine bessere Vergleichbarkeit zur weiteren Analyse der Ovarfunktion nur die WT-Mäuse mit dem Vaginalbefund eines Met- bzw. Diöstrus berücksichtigt (n = 5).

Die bei den WT-Kontrollmäusen vorgefundene Erscheinungsvielfalt des Vaginalepithels mit Abgrenzbarkeit von Proöstrus, Östrus, Metöstrus und Diöstrus im histologischen Präparat spricht für ein reguläres Zyklusgeschehen (Abb. 5 C).

Sofern die bei einigen der Tiere vorab gewonnenen Vaginalabstriche zytologisch zu beurteilen waren, stimmte ihr zytologisches Bild mit dem histomorphologisch ermittelten Stadium überein (Abb. 5 D).



**Abb. 5:** **A** und **B** – Repräsentative HE-Präparate von Vaginen der untersuchten *Smo*-KO-Mäuse (n = 24) mit einem von Entzündungszellen (neutrophile und eosinophile Granulozyten – Pfeile in **A**) stark durchdrungenen, mehrschichtigen Plattenepithel entsprechend dem Met-/ Diöstrus. Ausschnittaufnahme der oberen Zellschichten mit Ansammlungen von Entzündungszellen in stark erweiterten Zellzwischenräumen (Sterne in **B**).

**C** – Repräsentative HE-Präparate von Vaginen der untersuchten WT-Kontrolltiere (n = 27) mit im Aufbau unterschiedlichem Epithel entsprechend eines regelrechten Ovarialzyklus mit etwa hälftiger Verteilung auf Met-/ Diöstrus (n = 13) und Proöstrus/ Östrus (n = 14). **D** – Sehr gute Korrelation zwischen Vaginalzytologie und - histologie hinsichtlich der Zuordnung der WT-Kontrolltiere zu den einzelnen Zyklusphasen (exemplarisch für Diöstrus und Östrus). Vergrößerungen jeweils wie angegeben.

Der Vaginalbefund der zusätzlich untersuchten, heterozygoten *Smo*- Mäuse weicht deutlich von jenem der homozygoten *Smo*-KO-Mäuse ab (Abb. 7 vergl. mit Abb. 5 A). Das Vaginalepithel ist in den heterozygoten *Smo*-Mäusen vielschichtig verschleimend oder verhornend und ohne nennenswertes entzündliches Infiltrat. Das histomorphologische Bild gleicht bei den 5 untersuchten *Smo*-Weibchen jeweils jenem eines Vaginalepithels im Proöstrus/ Östrus. Somit liegt das bei den homozygoten *Smo*-KO-Tieren vorgefundene Bild eines im Met- bzw. Diöstrus persistierenden Epithels bei den heterozygoten *Smo*-Mäusen nicht vor.

## **6.4 Mikroskopie der Ovarien**

### **6.4.1 Kleine Ovarien**

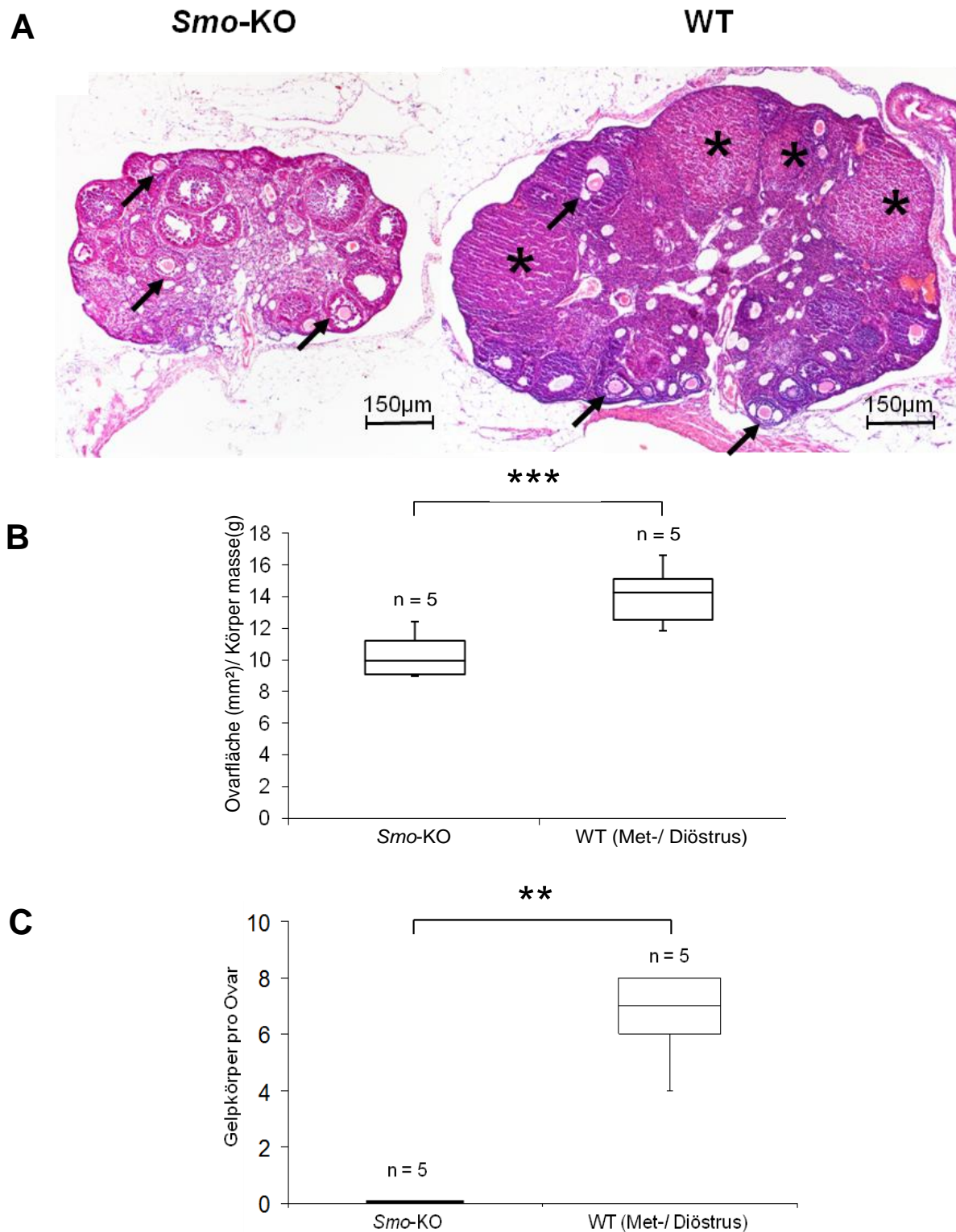
Die Vermessung der in Serie geschnittenen Ovarien unter dem Mikroskop bestätigt den bereits makroskopisch gewonnen Eindruck eines Größenunterschieds der Ovarien der *Smo*-Ko- und WT-Kontrollmäuse (Abb. 6). Die Ovarien der *Smo*-KO-Tiere sind im Mittel um mehr als ein Drittel kleiner (63 %) als die Ovarien der WT-Kontrolltiere. Der signifikante ( $p= 0,0003$ ) Unterschied in der Organgröße besteht weiter fort, wenn man die Größe der Ovarien in Relation zur Körpermasse stellt und dann vergleicht (Abb. 6 B). Die Ovarien der *Smo*-Ko-Mäuse sind folglich reell größengemindert und nicht nur relativ kleiner bei einem allgemein kleineren Körperbau.

Die Größe der Ovarien der WT-Kontrollmäuse in der Follikelphase (Proöstrus und Östrus) und der Gelbkörperphase (Metöstrus und Diöstrus) sind größenmäßig vergleichbar (maximale Längsschnittfläche des Ovars im Mittel 3,5 mm<sup>2</sup> bzw. 3,2 mm<sup>2</sup>; nicht gezeigt).

### **6.4.2 Fehlen von Gelbkörpern (Corpora lutea)**

Die sich makroskopisch und im Vaginalbefund bereits abzeichnende Störung des ovariellen Zyklus findet sich auch in der Histologie der Ovarien bestätigt. Schon in der Übersicht fällt bei den Ovarien der 12 Wochen alten *Smo*-KO-Mäuse ein helles Grundgewebe auf, in dem sich zwar heranwachsende und heranreifende Follikel abheben, welches aber frei von Gelbkörpern ist (Abb. 6 A).

In keinem Ovar der *Smo*-KO-Mäuse findet sich ein aktiver Gelbkörper. Auch fehlen in den Ovarien der *Smo*-KO-Mäuse sonstige Hinweise auf zurückliegende Eisprünge, wie stark kollabierte, in Falten gelegte Follikel um nicht verschlossene Follikelhöhlen oder Corpora albicantia. Demgegenüber zeigen die parallel dazu ausgewerteten Ovarien der WT-Kontrollmäuse in der Follikel- und Gelbkörperphase durchschnittlich 6 Gelbkörper (Abb. 6 C).



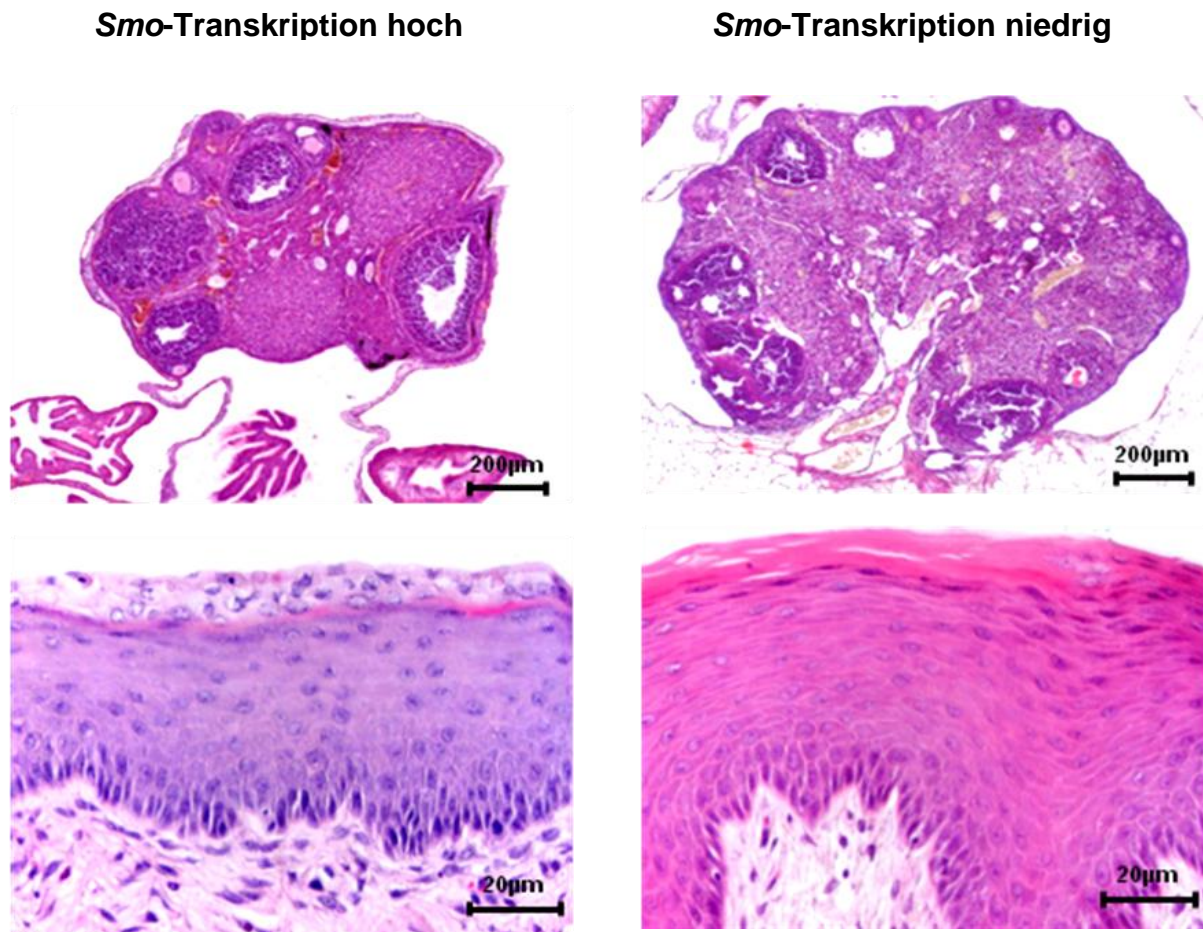
**Abb. 6:** **A** – Repräsentative HE-Schnitte der Ovarien einer *Smo-KO*- und einer *WT*-Kontrollmaus. Die deutlich kleineren Ovarien der *Smo-KO*-Mäuse mit hellem Grundgewebe, Follikeln in verschiedenen Stadien der Follikulogenese (Pfeile), Gelbkörper fehlen. Im Ovar der *WT*-Kontrollmaus Gelbkörper (Sterne) neben Follikeln entsprechend eines ovariellen Zyklus. Vergrößerungen wie angegeben.

**B** – Um etwa 1/3 hoch signifikant ( $p=0,0003$ ) reduzierte maximale Längsschnittfläche des Ovars in Bezug zur Körpermasse bei den *Smo-KO*-Tieren im Vergleich zu den *WT*-Kontrollmäusen im Met-/ Diöstrus (jeweils  $n = 5$ ).

**C** – Kein Nachweis von Gelbkörpern bei den *Smo-KO*-Tieren im Vergleich zu den *WT*-Kontrollmäusen im Met-/ Diöstrus (jeweils  $n = 5$ ;  $p=0,008$ ).



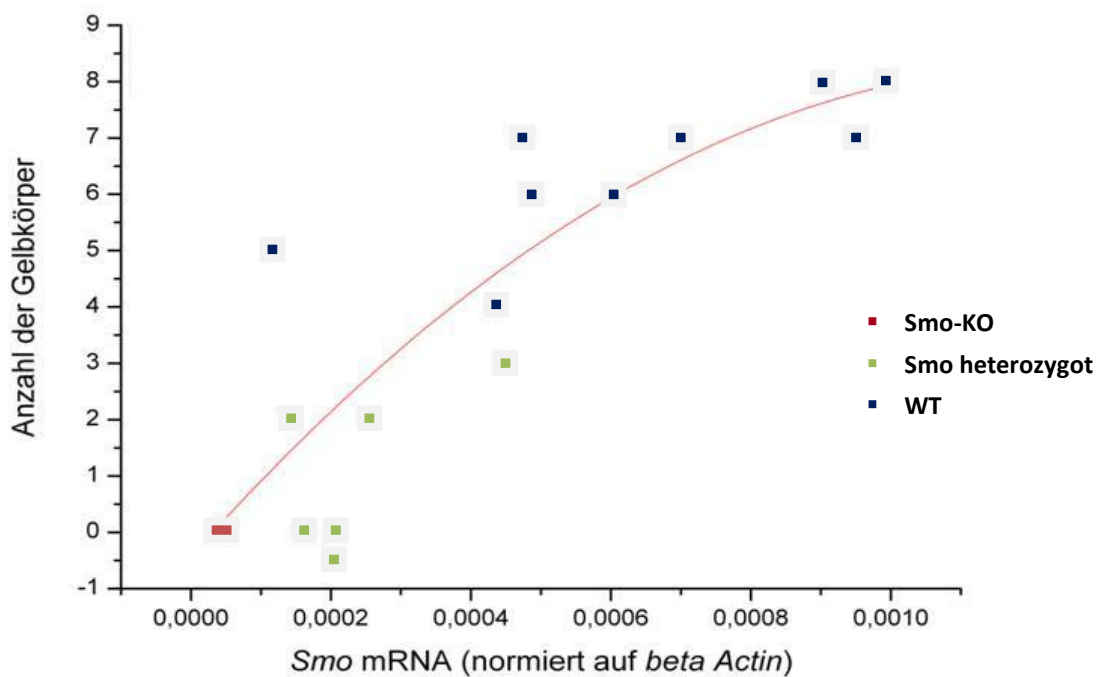
Die Ovarien der heterozygoten, weiblichen *Smo*-Mäuse lassen neben Follikeln in verschiedenen Stadien der Follikulogenese insbesondere eine unterschiedlich große Zahl an Gelbkörpern erkennen (Abb. 7). Es wurden pro linkem Ovar 0, 0, 2, 2 bzw. 3 Gelbkörper gezählt. In den Ovarien ohne Gelbkörper ist das interfollikuläre Gewebe von hypertrophen Zellen in Zellballen und -nestern dominiert; ansonsten ist das interfollikuläre Gewebe eher unauffällig.



**Abb. 7:** Repräsentative HE-Präparate in Ovarien (oben) und Vaginen mit einem dem Proöstrus/ Östrus ähnelndem Bild (unten) bei heterozygoten, weiblichen *Smo*-Mäusen. Das linke Ovar mit Gelbkörpern stammt von einer Maus mit hoher *Smo*-Resttranskriptionsrate in den Hepatozyten; das rechte, Gelbkörper-freie Ovar stammt von einer Maus mit niedriger *Smo*-Resttranskriptionsrate in den Hepatozyten. Vergrößerungen wie angegeben.

In der Folge korrelierte Frau Dr. Matz-Soja die ermittelten Gelbkörperzahlen der heterozygoten, weiblichen *Smo*-Mäuse sowie die Gelbkörperzahlen der verwendeten WT-Mäuse mit den *Smo*-Transkriptions-Stärken, die sie zuvor durch qRT-PCR bei isolierten Hepatozyten der Tiere ermittelt hatte. Die Analyse ergab einen Korrelationskoeffizienten von etwa 0,8 mit einem starken polynomialen Zusammenhang, der zwischen den Gelbkörperzahlen in den Ovarien und den *Smo*-Transkription-Stärken in den Leberzellen der Tiere besteht (Abb. 8).





Modell	Polynomial		
Gleichung	$y = \text{Intercept} + B1 \cdot x^1 + B2 \cdot x^2$		
Gewichtung	Keine Gewichtung		
Fehler der Summe der Quadrate	33,21813		
Kor. R-Quadrat	0,77891		
		Wert	Standardfehler
B	Schnittpunkt mit der Y-Achse	-0,42833	0,75604
B	B1	13958,31843	4125,81003
B	B2	-5,58487E6	4,10272E6

**Abb. 8:** Graphische Darstellung der Korrelationsanalyse der Gelbkörperzahlen der homozygoten und heterozygoten, weiblichen *Smo*-Mäuse sowie der WT-Kontrolltiere mit der *Smo*-Transkriptions-Stärke in isolierten Hepatozyten der Tiere. Starker polynomialer Zusammenhang mit einem Korrelationskoeffizienten von etwa 0,8.

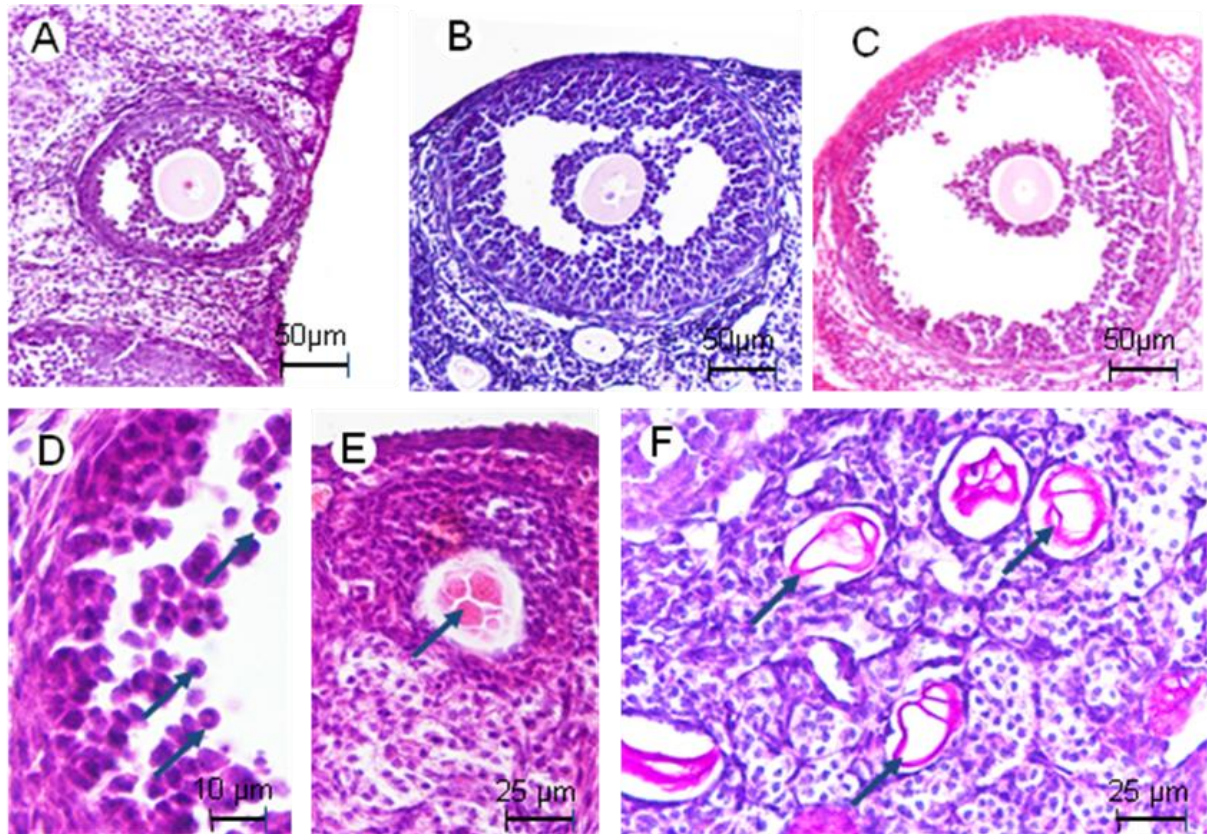
#### 6.4.3 Geringere Entwicklungskompetenz der Follikel

Die in den Ovarien der *Smo*-KO-Mäuse wie auch der WT-Kontrolltiere heranwachsenden und heranreifenden Follikel liegen in allen drei biologisch-funktionell bedeutsamen Größenkategorien vor (Durchmesser 100 - 249  $\mu\text{m}$ ; 250 - 349  $\mu\text{m}$ ; > 350  $\mu\text{m}$ ).

Die Gesamtfollikelzahl ist bei den fünf ausgewerteten *Smo*-KO-Mäusen und bei den fünf WT-Kontrolltieren sowohl in der Follikel-, als auch der Gelbkörperphase für alle drei Größenkategorien statistisch gesehen gleich, obwohl sich tendenziell weniger kleine Follikel bei den *Smo*-KO-Mäusen als bei den WT-Kontrolltieren fanden.

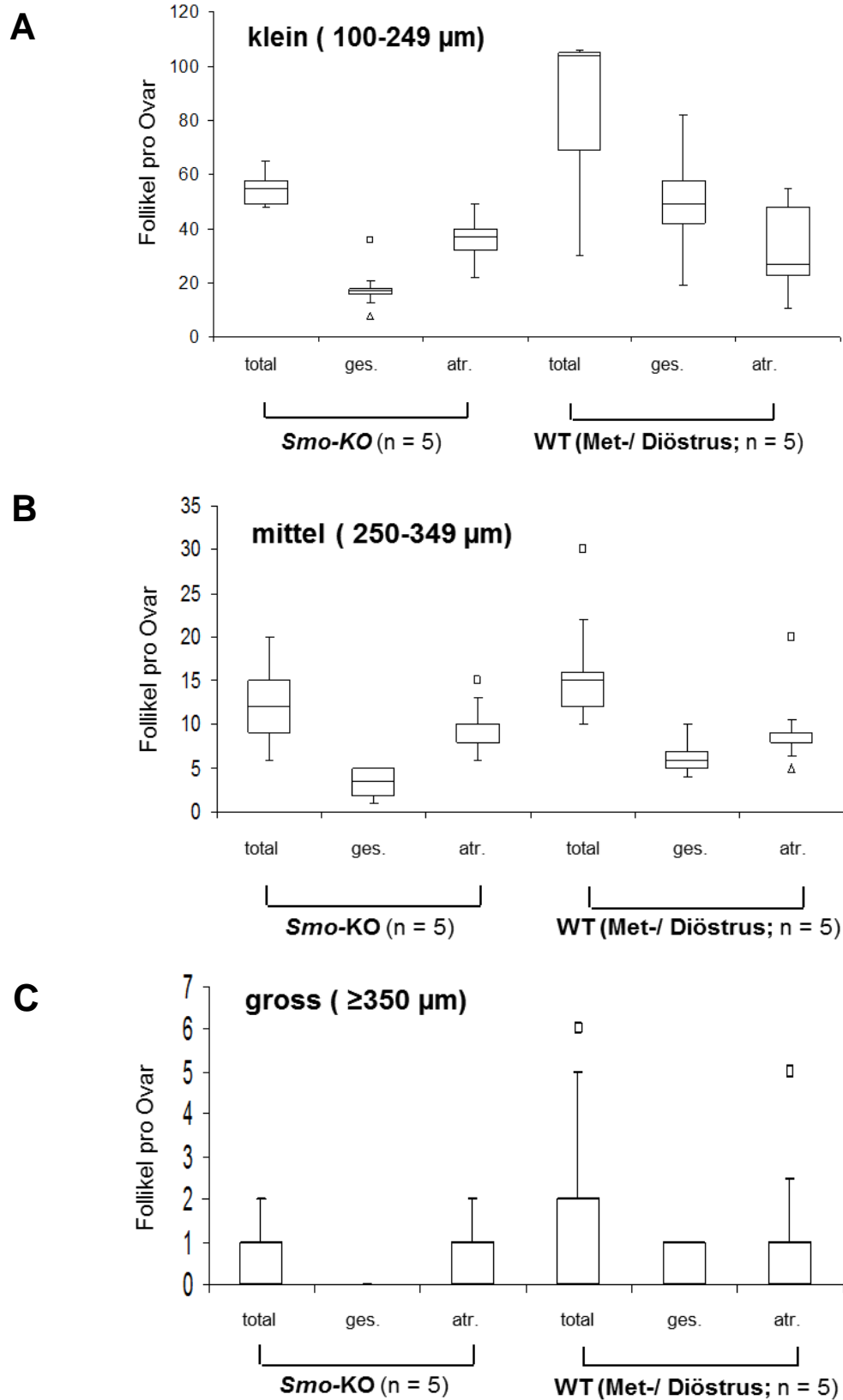
Dagegen sind hinsichtlich des Gesundheitszustandes der Follikel schon bei den kleinen Untersuchungsmengen signifikante Unterschiede in den Follikeln der verschiedenen Größenkategorien auszumachen (Abb. 9). In allen drei Größenkategorien ist der Anteil atretischer Follikel bei den *Smo*-KO-Mäusen höher als bei den WT-Kontrolltieren (Abb. 10). Die mittlere Atresierate ist bis zu 50 % erhöht (Abb. 11). Bei den Follikeln der Größenordnung 250 – 349  $\mu\text{m}$  ist der Unterschied in der Atresierate signifikant ( $p = 0,016$ ). In der Kategorie der großen, präovulatorischen Follikeln (> 350  $\mu\text{m}$ ) kommen gesunde Follikel bei den untersuchten *Smo*-KO-Mäusen nicht vor.

Keine Unterschiede ergeben sich dagegen bei der Auszählung der kollabierten, degenerativ aufgequollenen Zonae pellucidae im Stroma. Im Stroma der *Smo*-KO-Mäuse und WT-Kontrolltiere sind die übrig gebliebenen Zonae pellucidae in annähernd gleicher Häufigkeit zu finden (Abb. 12). Die gesteigerte Atresierate bei den Follikeln der *Smo*-KO-Mäuse spiegelt sich somit in der Anzahl der im Stroma liegenden Zonae pellucidae nicht wider.

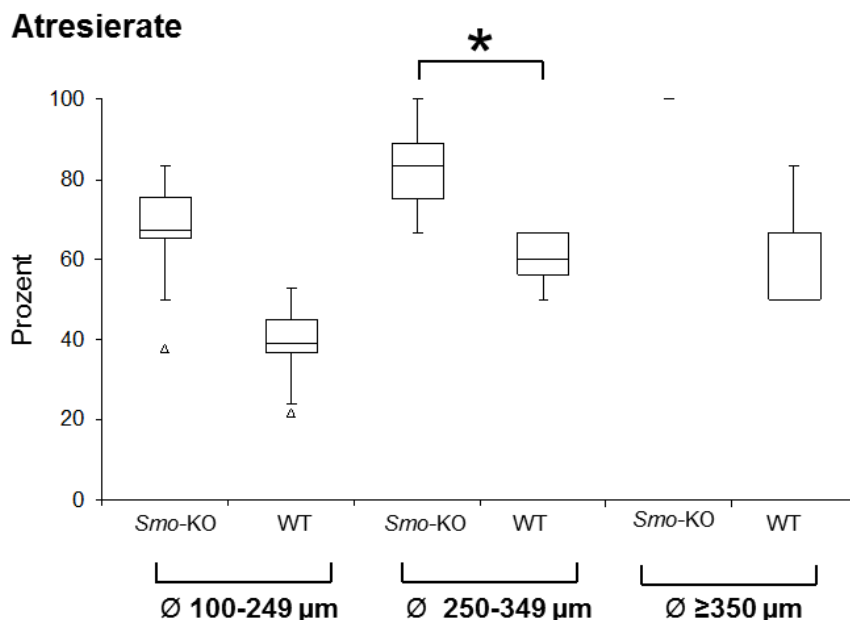


**Abb. 9:** **A bis C** – Ausschnitte aus Ovarien von *Smo*-KO-Tieren mit typischen Follikeln in Wachstum und Reifung. Exemplarische Abbildung gesunder Follikel entsprechend der funktionell bedeutsamen Größenkategorien; **A:** Ø 100 - 249 µm; **B:** Ø 250 - 349 µm und **C:** Ø > 350 µm.

**D bis F** – Darstellung atretischer Veränderungen. Stark vergrößerte murale Granulosa eines antralen Follikels mit zahlreichen apoptotischen Körperchen im mehrschichtigen Epithel (Pfeile in **D**). Zugrunde gegangener, präantraler Follikel mit exzentrisch gelegener, unrunder und stark fragmentierter Eizelle (Pfeil in **E**). Ausschnitt aus dem Mark eines Ovars mit zahlreichen homogen erscheinenden, glasig aufgequollenen Zonae pellucidae als besonders lang verbleibende Reste atretischer Follikel früherer Zyklen in einem hellen Grundgewebe (Pfeile in **F**). Vergrößerungen wie angegeben.

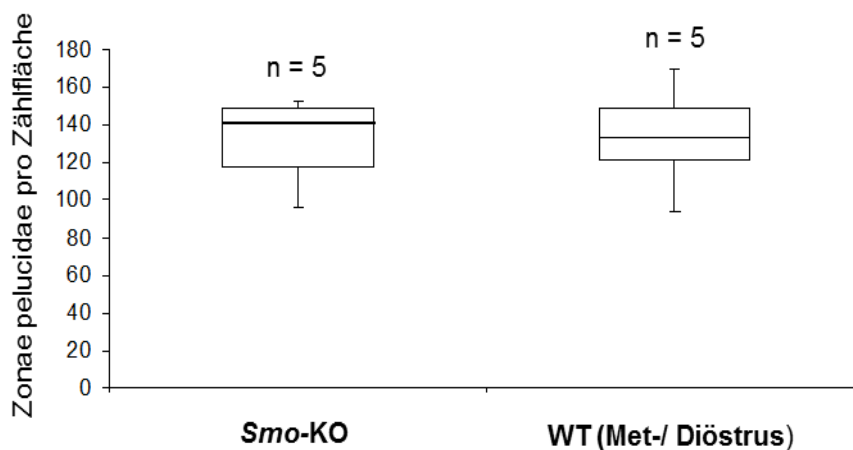


**Abb. 10:** Anzahl wachsender und reifender Follikel in den Ovarien der *Smo-KO*-Mäuse und WT-Kontrolltiere des Met-/ Diöstrus (jeweils n = 5) und die Verteilung auf die drei funktionell bedeutsamen Größenkategorien **A:**  $\varnothing$  100 - 249  $\mu\text{m}$ ; **B:**  $\varnothing$  250 - 349  $\mu\text{m}$  und **C:**  $\varnothing$   $\geq$  350  $\mu\text{m}$ ; sowie die Verteilung gesunder Follikel (ges.) und atretischer Follikel (atr.) aus der Gesamtfollikelzahl (total). Tendenziell weniger wachsende und reifende Follikel in allen Größenkategorien bei den *Smo-KO*-Mäusen.



**Abb. 11:** Atresierate (Anteil atretischer Follikel an der Gesamtfollikelzahl) der *Smo*-KO-Mäuse und WT-Kontrolltiere (jeweils  $n = 5$ ) abhängig von den drei funktionell bedeutsamen Größenkategorien. Tendenziell höhere Atresierate für alle berücksichtigten Follikel bei den *Smo*-KO-Mäusen mit signifikantem ( $p = 0,016$ ) Unterschied bei Follikeln der Größenkategorie Ø 250 - 349 µm. Bei Ø > 350 µm ausschließlich atretische Follikel bei den *Smo*-KO-Mäusen.

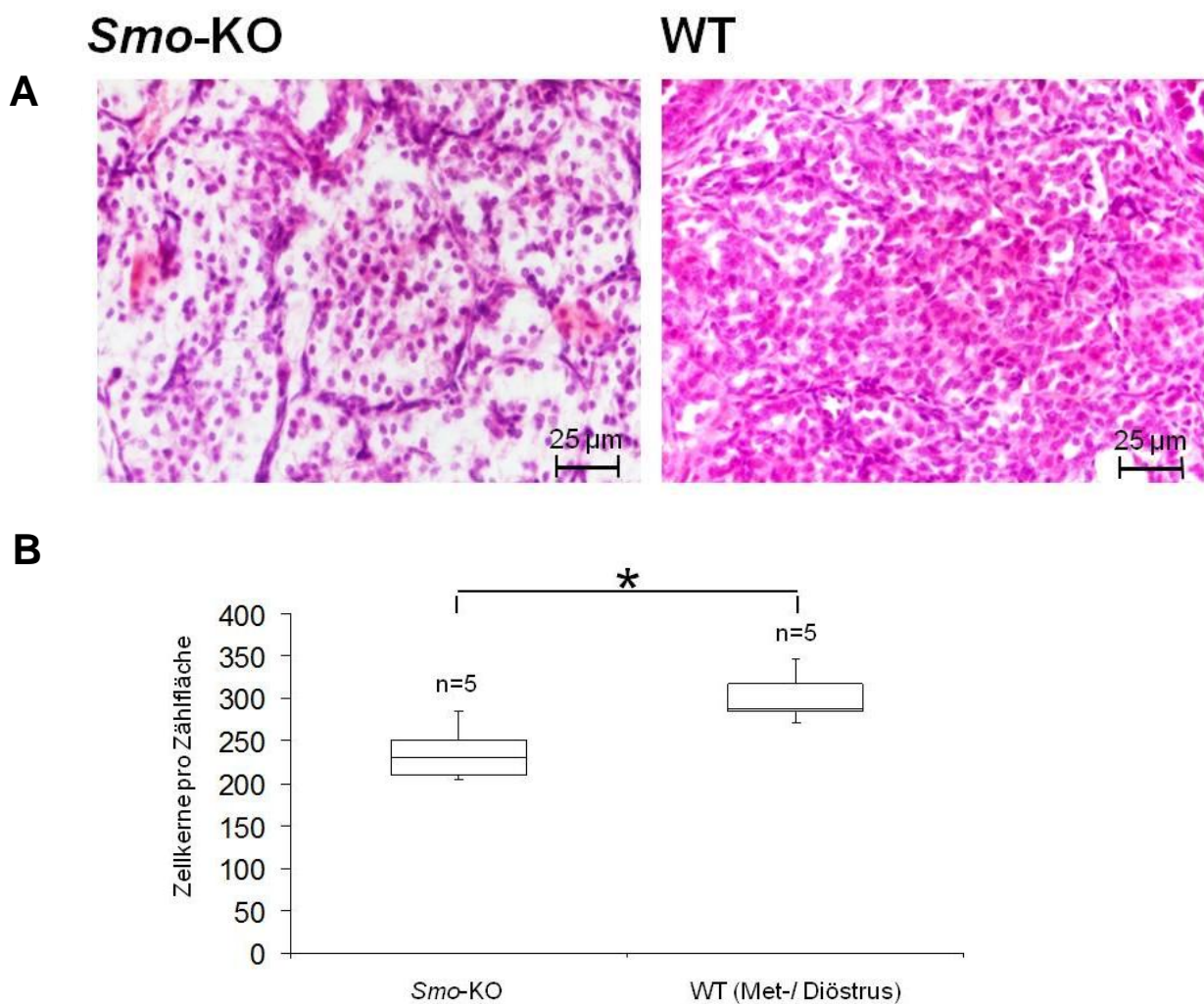
### Zonae pellucidae



**Abb. 12:** Anzahl freiliegender Zonae pellucidae (lange verbleibende Reste atretischer Follikel) im Grundgewebe, vergleichbare Häufigkeit in den Ovarien der *Smo*-KO-Mäuse und WT-Kontrolltiere.

#### 6.4.4 Interstitielle Hypertrophie

Schon in der Übersicht fällt bei den Ovarien der 12 Wochen alten *Smo*-KO-Mäuse ein helles Grundgewebe auf. Dieses besteht aus ausgedehnten knotigen Nestern aus großen, klaren Zellen, welche zum Teil durch fibröse Septen voneinander getrennt sind. Durch ihr verringertes Zellkern-Zellplasma-Verhältnis vermindern die hellen Zellen die Zellkerndichte im Grundgewebe der *Smo*-KO-Mäuse gegenüber den WT-Kontrolltieren signifikant ( $p=0,016$ , Abb. 13). Näher betrachtet fällt zudem auf, dass die Zellen der Theca folliculi zum Teil von atretischen Tertiärfollikeln in den *Smo*-KO-Ovarien die typischerweise eher flache, zirkuläre Struktur missen lassen und ein ähnlich aufgeworfenes, klarzelliges Erscheinungsbild zeigen.

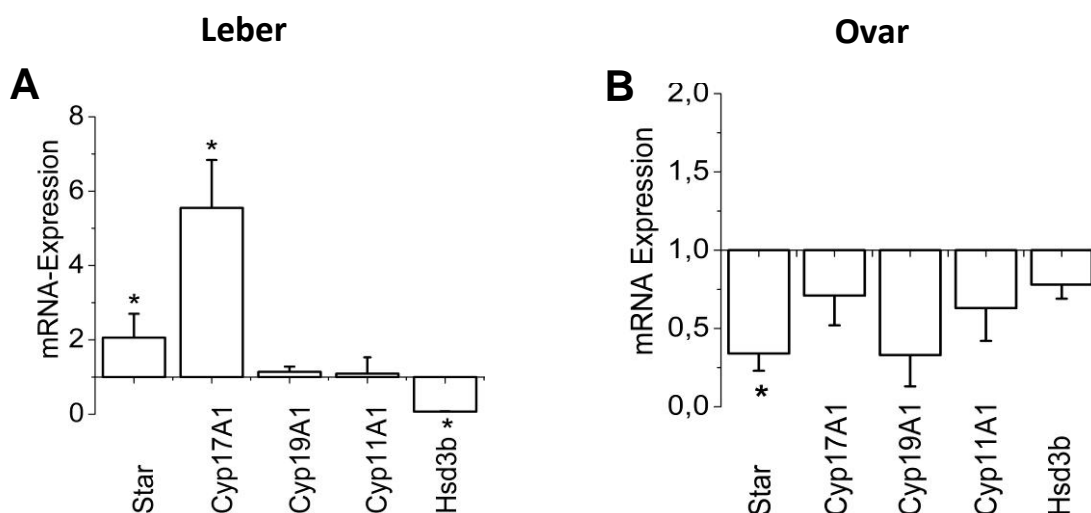


**Abb. 13:** **A** – Repräsentative HE-Präparate der Ovarien. Bei den *Smo*-KO-Mäusen auffallend hyperplastisches Grundgewebe mit hellen, zytoplasmareichen, durch schmale Bindegewebssäume zu Zellnestern und -ballen zusammengefassten Zellen. Hingegen Zytoplasma-ärmere Zellen in den Zellballen und -nester der WT-Kontrolltiere. Vergrößerungen wie angegeben. **B** – Signifikant ( $p= 0,016$ ) weniger Zellkerne pro Zählfläche im Grundgewebe der *Smo*-KO-Tieren als bei den WT-Kontrolltieren, im Wesentlichen wahrscheinlich durch den unterschiedlichen Zytoplasmaanteil bedingt.

## 6.5 Transkriptionsmuster von Proteinen der Steroidbiosynthese

In den *Smo*-KO-Mäusen ist die Expression des Gens für die 17 $\alpha$ -Hydroxylase (*Cyp17A1*) in der Leber signifikant ( $p=0,002$ ) gesteigert. Auf mRNA-Ebene finden sich in den Leberzellpräparaten der *Smo*-KO-Tiere sieben- bis achtmal mehr *Cyp17A1*-Transkripte als bei den WT-Kontrolltieren. In den Ovarien der *Smo*-KO-Mäuse wird *Cyp17A1* vermindert exprimiert, jedoch nicht signifikant.

Das Gen für das Protein StAR liegt in der Leber signifikant gesteigert vor ( $p=0,02$ ), während die Expression von *Star* im Ovar signifikant vermindert ist ( $p=0,03$ ). Die anderen Schlüsselenzyme der Steroidhormonsynthese, P450cc [*Cyp11a1*], 3 $\beta$ -HSD und Aromatase [*Cyp19a 1*] werden im Ovar vermindert exprimiert, jedoch nicht signifikant. *Cyp11a1* und *Cyp19a1* zeigen keine relevanten Veränderungen der Expression in der Leber, während sich signifikant weniger Transkripte von 3 $\beta$ -Hsd in den Hepatozyten finden lassen ( $p=0,001$ , Abb. 14).



**Abb. 14:** Mittlere relative Expression von Transkripten, deren Proteine sich an der Sexsteroidhormonsynthese beteiligen, normiert auf *beta-Aktin* in der Leber (**A**) und im Ovar (**B**).

**A:** In den Lebern der *Smo*-KO-Mäuse im Vergleich zu den WT-Kontrolltieren (jeweils  $n = 7$ ) signifikant ( $p=0,002$ ) mehr Transkripte für das Enzym *Cyp17a1*, bei gleichzeitig signifikant ( $p=0,001$ ) weniger Transkripten für 3 $\beta$ -Hsd. Zudem signifikant ( $p=0,02$ ) mehr Transkripte für *Star*, bei unveränderter Menge an Transkripten für *Cyp11A1* und *Cyp19A1*. **B:** In den Ovarien der *Smo*-KO-Mäuse ( $n = 11$ ) im Vergleich zu den WT-Kontrolltieren ( $n = 8$ ) generelle Verminderung der entsprechenden Transkripte, für *Star* signifikante ( $p=0,03$ ) Minderung (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Matz-Soja).



## 6.6 Steroidhormon- und IGF-1-Werte im Serum

DHEA, als ein Produkt des Enzyms CYP17A1, ist im Serum der *Smo*-KO-Mäuse um ein Vielfaches gegenüber den Serumwerten bei den WT-Kontrolltieren erhöht ( $p=0,02$ ). Die Werte der anderen Steroidhormone Androstendion, Testosteron, Progesteron, 17-Hydroxyprogesteron und 11-Desoxycortisol bewegen sich dagegen im Bereich der Werte der WT-Kontrolltiere. IGF-1 zeigt sich im Serum statistisch hoch signifikant vermindert ( $p<0,0001$ ), während IGFBP-1 signifikant erhöht ist ( $p=0,04$ , Tab. 3).

Hormon	Konzentration in ng/ml		p-Wert (MWU-Test)
	WT	KO	
<b>Androstendion</b>	0,13 +/- 0,03	0,10 +/- 0,03	0,3
<b>Testosteron</b>	0,07 +/- 0,03	0,09 +/- 0,05	0,3
<b>Progesteron</b>	3,21 +/- 3,42	0,96 +/- 0,554	0,1
<b>17-OH-Progesteron</b>	2,46 +/- 0,78	1,48 +/- 1,45	0,3
<b>11-Desoxycortisol</b>	56,53 +/- 14,03	45,53 +/- 25,03	0,3
<b>DHEA</b>	24,07 +/- 12,69	68,02 +/- 28,59	0,02
<b>IGF-1</b>	413,25 +/- 29,90	108,38 +/- 23,68	< 0,0001
<b>IGFBP-1</b>	3,04 +/- 0,54	5,23 +/- 0,89	0,04

**Tab. 3:** Steroidhormonwerte (jeweils  $n = 9$ ) und die Werte für IGF-1/ IGFBP-1 (jeweils  $n = 24$ ) im Serum von *Smo*-KO-Mäusen und WT-Kontrolltieren. Passend zu den Leberbefunden signifikant ( $p=0,02$ ) erhöhte Werte für das unter der Wirkung von Cyp17A1 entstehende Vorläuferhormon DHEA bei tendenziell erniedrigten, unter der Mitwirkung von 3 $\beta$ -HSD entstehenden, Hormonen. Zudem hoch signifikante ( $p<0,0001$ ) Verminderung von IGF-1 und signifikante ( $p=0,04$ ) Steigerung von IGFBP-1. p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test (MWU) ermittelt (Tabelle mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Matz-Soja).



## 7. DISKUSSION

Tiermodelle können weiterführende Hinweise zur Pathophysiologie einer Krankheit oder eines Syndroms geben. Ferner sind sie in der Regel nötig, um neue Therapieansätze vor deren Anwendung am Menschen zu testen. Es existieren bereits sowohl verschiedene auf einem genetischem Defekt beruhende Mausmodelle (Barnett et al., 2006), als auch chemisch und hormonell induzierte Rattenmodelle (Arai et al., 1981, Manneras et al., 2007), die Symptome eines PCOS zeigen. Bislang deckt jedoch keines dieser Tiermodelle die gesamte Symptompalette des PCOS ab (Legro, 2000; Szukiewicz and Uilenbroek, 1998). Dies gilt insbesondere für den erhöhten Androgenspiegel und die Leberfunktionsstörungen, die gehäuft mit einem PCOS vergesellschaftet sind (Legro, 2000). Die Androgenisierung ist aber ein herausragendes Charakteristikum des Leidens und wird für die Diagnosestellung eines PCOS neuerdings wieder vehement eingefordert (Goodarzi et al., 2011, Sathyapalan and Atkin, 2012). Die Ursachen, welche zu einem PCOS führen, werden weithin im Ovar vermutet. Die NAFL, die mit dem Leiden auftreten kann, gilt als Folgeerscheinung (Ciotta et al., 2011). Andererseits begleiten Zyklusstörungen und ein nicht erfüllter Kinderwunsch oft eine primäre Leberfunktionsstörung bei Frauen im gebärfähigen Alter (Laifer and Guido, 1995, Brzozowska et al., 2009) und sind häufig sogar die ersten Krankheitszeichen.

In dem hier untersuchten *Smo*-KO-Mausmodell treten nach fetaler Inaktivierung des Hh-Signaltransduktionswegs umfangreiche metabolische und strukturelle Veränderungen in der Leber auf (Matz et al., 2013), welche, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wird, gravierende Veränderungen in den weiblichen Reproduktionsorganen, Ovar und Vagina, nach sich ziehen und damit eine Infertilität erklären können.

Die Leber, die sowohl mikro- als auch makrovesikulär verfettet ist und dem Erscheinungsbild einer NAFL beim Menschen in weiten Zügen gleicht, zeigt Veränderungen im metabolischen Fettstoffwechsel (Matz et al., 2013), die, wie die Untersuchungen in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Matz-Soja aus der Arbeitsgruppe Prof. Gebhardt nun zeigen, die Bereitstellung und Verarbeitung von Cholesterol zu Androgenen, Gestagenen und Östrogenen mit einschließen. Es kommt zur vermehrten Transkription von Enzymen für die Synthese des Prohormons DHEA, wie *Cyp17a1*, bei gleichzeitig signifikant verminderter hepatischer Expression von *3β-Hsd*, welches DHEA im Steroidstoffwechsel weiter zu Androstendion umsetzt. Die Transkriptionsrate der anderen Enzyme für die Weiterverstoffwechselung von DHEA zu männlichen als auch weiblichen Sexualhormonen wie Testosteron und Östradiol, z.B. *Cyp19A1*, ist nicht relevant verändert. In der Tat wird ein signifikant erhöhter Spiegel von DHEA im Serum der *Smo*-KO-Mäuse gemessen. Es ist davon auszugehen, dass dieser auf der in der Leber erhöht vermuteten DHEA-Synthese beruht. Im Ovar der *Smo*-KO-Mäuse

sind die Enzyme für die DHEA-Synthese tendenziell, jedoch nicht signifikant vermindert exprimiert. Interessanterweise findet sich DHEA auch beim Menschen in einem frühen Stadium der NAFL im Serum signifikant erhöht (Koga et al., 2011). Ob auch hier die DHEA-Erhöhung im Serum hepatogen verursacht wird, oder aber die Nebenniere dafür verantwortlich ist, wie von den Autoren vermutet, bleibt zu klären. Bezüglich der hier vorgestellten Ergebnisse ist einschränkend anzumerken, dass die Nebenniere der Tiere als bekannter, wichtiger Syntheseort für Androgene beim Menschen bezüglich der Expression von Proteinen der Steroidhormonsynthese im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht wurde. Allerdings spielt die Nebenniere, anders als die Leber, bei Nagern eine eher unbedeutende Rolle für die im Serum zirkulierende DHEA-Menge (Cutler et al., 1978; Katagiri et al., 1998; Le Goascogne et al., 1991; Vinson et al., 1978; Vianello et al., 1997). Eine dennoch durchgeführte exemplarische, morphologisch-histologische Beurteilung der Nebenniere der WT- und *Smo*-KO-Mäuse ergab keinen pathologischen Befund. Ob jedoch der hepatische Knock-out von *Smo* auf subzellulärer Ebene adrenale Veränderungen sekundär herbeiführt, welche eine Erhöhung des DHEA-Spiegels im Serum mit begünstigen könnten, lässt sich derzeit nicht mit Sicherheit ausschließen und soll Inhalt weiterführender Untersuchungen sein.

Die leberspezifische Ausschaltung von *Smo* und die damit einhergehende Inaktivierung des Hh-Signaltransduktionswegs in der Fetalzeit führt im vorgestellten Tiermodell systemisch zur weiblichen Infertilität, deren Ursache, wie gezeigt werden konnte, im Ovar liegt. Eine Inaktivierung des Hh-Signaltransduktionswegs im Ovar selbst durch eine unerwünschte Mitaktivierung der Cre-Rekombinase im Ovar wurde bei dieser Mauslinie im Vorfeld sowie im Rahmen der jetzigen Arbeit ausgeschlossen. Dies war notwendig, da ein überaktiver (Migone et al., 2012) wie auch ein unteraktiver (Russell et al., 2007) Hh-Signaltransduktionsweg im Ovar selbst die Ovarialfunktion stört. Dies geschieht indem er scheinbar sowohl die vaskulären (Ren et al., 2009; Ren et al., 2012) als auch androgenen Vorläuferzellen des Interstitiums (Barsoum et al., 2009; Spicer et al., 2009) im adulten, nicht jedoch im embryonalen Ovar (Huang and Yao, 2010), beeinflusst.

Wie im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, beruht die Infertilität der weiblichen *Smo*-KO-Mäuse auf einer Ovarialinsuffizienz. In den Ovarien wird vor allem die Follikelreifung nicht bis zur Ovulation vorangetrieben. Zwar treten in den Ovarien Primordialfollikel, wenn auch in leicht verminderter Zahl, das Wachstum und die daran sich anschließende Follikelreifung an, jedoch bleibt die terminale Ausreifung der Follikel zu dominanten, eisprungsfähigen Graaf-Follikeln aus. Alle in den Reifungsprozess eintretenden Follikel gehen im Verlauf zu Grunde, wobei die Atresierate besonders in den größeren, Gonadotropin-abhängigen Follikeln signifikant erhöht ist. Die gesteigerte Atresie der großen, antralen Follikel bei nicht signifikant verminderter Gesamtzahl spricht eher für eine schwerwiegende hormonelle Dysregulation infolge des Hh-Knock-outs und weniger für eine

anlagenbedingte Störung, da das Wachstum und die Reifung der großen Follikel primär von hormonellen Einflüssen, insbesondere von Gonadotropinen und Steroidhormonen (Myers et al., 2004; Kagabu and Umezu, 2004), abhängig ist. Dass sich der vollständige Follikeluntergang nicht in der Anzahl der frei im Stroma liegenden Zonae pellucidae widerspiegelt – welche ein Anhaltspunkt für die in früheren Zeiten zu Grunde gegangene Follikel sind (Myers et al., 2004) – kann dem Umstand geschuldet sein, dass bei den *Smo*-KO-Tieren insgesamt tendenziell weniger Follikel als bei den WT-Kontrolltieren in die Follikulogenese eintreten und somit weniger atretische Follikel zu den frei im Stroma liegenden Zonae pellucidae beitragen können. Andere Erklärungen könnten ein rascherer Abbau und Abtransport der im Stroma freiliegenden Zonae pellucidae bei den *Smo*-KO- gegenüber den WT-Tieren oder eine vermehrte Follikelatresie in frühen Reifungsphasen sein, bei denen die Zona pellucida der Follikel noch nicht vollständig ausgebildet ist und/oder welche aufgrund eines Durchmessers  $< 100\ \mu\text{m}$  nicht quantifiziert worden sind. Es konnten insgesamt Ovarien von je fünf *Smo*-KO- und WT-Tieren ausgewertet werden. Nicht sicher auszuschließen ist, ob die nicht signifikante Verminderung der Gesamtfollikelzahl sowie die kaum abweichenden Zahlen der Zonae pellucidae Folgen der kleinen Untersuchungszahl sind. Damit bleibt offen, welchen Einfluss die interindividuellen Schwankungen in den beiden Kollektiven, insbesondere in den WT-Mäusen, auf die Ergebnisse haben könnten.

Passend zu dem vollständigen Untergang der Follikel sind in den Ovarien der *Smo*-KO-Mäuse keine Gelbkörper auffindbar. Ihr Fehlen und der stets gleichartige Aufbau des Vaginalepithels sind, zusammen mit dem vollständigen Untergang der in die Follikulogenese eintretenden Follikel, klare Zeichen für einen monophasisch-anovulatorischen Zyklus. Interessanterweise erinnert das monotone Bild der in den Vaginen der *Smo*-KO-Tiere vorgefundenen Schleimhautepithelien – ein vielschichtiges, stark von Leukozyten durchdrungenes Epithel – eher an das Bild einer Vaginalschleimhaut von Mäusen im Met-/ Diöstrus als im Proöstrus oder Östrus. Ein denkbarer Pathomechanismus hierfür könnte sein, dass das im Körper befindliche Östrogen und Progesteron ausreicht, um einen vielschichtigen Aufbau der Vaginalschleimhaut zu gewährleisten, nicht aber um die darauf aufbauende präovulatorische Muzifizierung und anschließende Keratinisierung herbei zu führen (Barker and Walker, 1966). Da vermutlich der rasche präovulatorische LH-Anstieg ausbleibt und keine Progesteron-bildenden Gelbkörper entstehen, bleibt die regelmäßige zyklische Erneuerung der Vaginalschleimhaut am Ende des aktuellen und zu Beginn des neuen Zyklus aus. Die so überdauernde Vaginalschleimhaut ist für Irritationen und eine Besiedlung mit Keimen seitens des Lumens empfänglicher, was die starke Infiltration mit neutrophilen und eosinophilen Granulozyten erklären könnte (Van Der Schoot, 1975). Die vorgefundenen Verhältnisse im Vaginalepithel sind durchaus mit Veränderungen zu vergleichen, wie sie juvenile Tiere vor der Geschlechtsreife oder alternde Tiere nach der Geschlechtsreife zeigen (Nelson et al., 1982) oder wie sie auch in Mäusen nach Ovariectomie zu finden sind (Suzuki et al., 1996).

Die *Smo*-KO-Mäuse sind anovulatorisch und weisen, wie die Hormonmessungen im Serum zeigen, signifikant erhöhte Werte an DHEA auf, welches auch das im Serum von PCOS-Patientinnen vorgefundene Androgen mit der höchsten Konzentration ist (Motta, 2010). Sie erfüllen somit zwei der wichtigsten Kriterien für die Diagnose eines PCOS beim Menschen (Franks, 1995, Artini et al., 2010; Sheehan, 2004), können aber dennoch nicht als ein murines Modell für dieses Syndrom gelten, da die Ursache des erhöhten DHEA-Spiegels nicht, wie beim PCOS angenommen, intra-ovariell (Jonard and Dewailly, 2004), sondern extra-ovariell, nämlich hepatisch bedingt zu sein scheint, wie das Transkriptionsmuster von Proteinen der Steroidbiosynthese in der Leber nahelegt. Hinzu kommt, dass die morphologischen und enzymatischen Veränderungen in den Ovarien der *Smo*-KO-Mäuse z.T. grundsätzlich von den beschriebenen Veränderungen beim PCOS beim Menschen abweichen. So sind humane PCOS-Ovarien größer als gesunde Ovarien und mit großen, zystischen Follikeln übersät (Porter, 2008; Stein and Leventhal, 1935). Generell ist die Zahl der wachsenden und reifenden Follikel in ihnen eher gesteigert (Webber et al., 2003; Webber et al., 2007) und die Expression und Aktivität von 3 $\beta$ -HSD und CYP17A1 im ovariellen Interstitium erhöht (Nelson et al., 1999; Wood et al., 2004). Hinzu kommt, dass beim PCOS die Werte für freies IGF-1 im Serum erhöht und die Werte für IGFBP-1 erniedrigt sind (Berker et al., 2004; Iwashita et al., 1990; Orio et al., 2003; Thierry van Dessel et al., 1999).

Aus diesem Grunde sind die *Smo*-KO-Mäuse eher als ein Modell für primär an einer NAFL erkrankte Frauen mit einer sich sekundär ausbildenden PCOS-Symptomatik zu betrachten, welche in Hinblick auf die gültigen Diagnosekriterien (gemäß NIH bzw. ESHRE/ASRM) auch nicht zwingend polyzystische Ovarien zeigen müssen. Hierfür spricht, dass Patientinnen mit einer NAFL im Frühstadium erhöhte DHEA-Werte im Serum zeigen (Koga et al., 2011) und dass erhöhte DHEA Werte im Blut bei Nagetieren zu ovariellen Veränderungen führen können, wie sie bei den *Smo*-KO-Mäusen beobachtet werden (Lee et al., 1998; Roy et al., 1962).

Ob der Einfluss von DHEA auf das Ovar bei den *Smo*-KO-Mäusen direkt erfolgt, wie bei hepatisch bedingtem IGF-1-Mangel vorgeschlagen (Della Torre et al., 2011), und/oder indirekt über die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse, wie bei IGF-1-Mangel ebenfalls möglich (Cui et al., 2003) bleibt offen. Ebenso bleibt zu ergründen, ob die Veränderungen im Ovar alleine auf der systemischen Erhöhung von DHEA beruhen, oder aber noch andere Veränderungen in der Leber, wie zum Beispiel der erwähnte IGF-1 Mangel, eine Wirkung auf die interstitielle Thekazell-Entwicklung (Huang et al., 2001) und LH-gesteuerte Thekazell-Funktion (Magoffin and Weitsman, 1994) ausüben. Die Serumanalysen von IGF-1 und IGFBP-1, welche eine signifikant verminderte Serumkonzentration von IGF-1 bei zugleich erhöhter Serumkonzentration von IGFBP-1 zeigten, decken sich mit den Ergebnissen der Transkriptionsanalyse von *Igf-1* und *Igfbp-1* in der Leber der *Smo*-KO-Mäuse, wie von

Matz-Soja et al. 2014 beschrieben. So wird in den Hepatozyten der *Smo*-KO-Mäuse in der Tat IGF-1 vermindert, das IGFBP-1 hingegen vermehrt gebildet, was insgesamt die Bioverfügbarkeit von IGF-1 im Körper und insbesondere im Ovar mindern dürfte (Matz-Soja et al., 2014; Froment et al., 2002). Bemerkenswerterweise sind IGF-1-defiziente, weibliche Mäuse aufgrund einer während der Follikelreifung arretierenden Follikulogenese infertil (Baker et al., 1996). Transgene, weibliche Mäuse mit allgemein (Huang et al., 1997) bzw. hepatisch gesteigerter Synthese von IGFBP-1 sind ebenfalls infertil oder reduziert fertil. Diese Mäuse zeigen eine verminderte Körpergewichtsentwicklung und konsekutiv verminderte Organengewichte. Bei den Genitalorganen ist die Gewichtsreduktion sogar unverhältnismäßig stärker (Froment et al., 2002). Die Organveränderungen sind mit jenen der hier untersuchten *Smo*-KO-Mäuse vergleichbar. Die Epithelien der Vaginen vollziehen keinen charakteristischen Epithelwechsel. In den Ovarien ist die terminale, Gonadotropin-abhängige Phase der Follikelreifung gestört, es liegen keine oder nur sehr wenige Gelbkörper vor und die Reaktivität der Ovarien auf von außen zugeführte Gonadotropine ist vermindert.

Die Ursache für das klarzellige, in Zellballen strukturierte ovarielle Interstitium, wie es bei den *Smo*-KO-Mäusen vorzufinden ist, bleibt zunächst unklar. Denkbar ist hierbei eine gestörte Differenzierung und Reifung von Theka-Vorläuferzellen, wie es für pathologisch veränderte LH- oder IGF-1-Konzentrationen beschrieben ist (Huang et al., 2001; Magoffin and Weitsman, 1994). Eine andere denkbare Ursache könnte eine vermehrte Aufnahme und Akkumulation von Substraten der Steroidhormone sein, welche aufgrund des hepatisch verursachten Hyperandrogenismus nicht weiter zu Androgenen verstoffwechselt werden und somit der Östrogensynthese nicht mehr zur Verfügung stehen. Gegen eine vermehrte Aufnahme von Substraten spricht jedoch, dass die Expression des Proteins StAR, welches für die Aufnahme von Cholesterol in die Thekazellen entscheidend ist, im Ovar vermindert exprimiert wird.

In der Zusammenschau ist die Ovarialinsuffizienz der hepatischen *Smo*-KO-Mäuse somit eher nicht auf einen singulär gestörten hepatischen Hormonmetabolismus zurückzuführen, sondern beruht vielmehr auf einem multifaktoriellen Geschehen, das noch der genauen Klärung bedarf. Hierbei könnten DHEA und andere Androgene die systemische Bioverfügbarkeit von IGF-1/IGFBP-1 regulieren, eventuell unter Einbezug des hypothalamo-hypophysären Wachstumshormons (engl. growth hormone, GH) (Legan et al., 2002; Morales et al., 1994; Teixeira et al., 2002), oder im Gegenzug könnten IGF-1/IGFBP-1 Einfluss auf die Steroidhormonbiosynthese in der Leber und anderer steroidogener Organe einschließlich dem Ovar nehmen, ebenfalls unter einem möglichen Einbezug des hypothalamo-hypophysären Systems (Fottner et al., 1998; Mesiano et al., 1997, Mode and Gustafsson, 2006). Die Hypophyse wurde bei den hier untersuchten Tieren nicht mit entnommen, da es sich bei der hier vorgestellten Infertilität der weiblichen *Smo*-KO-Mäuse zunächst um einen unerwarteten Zufallsbefund im Rahmen der Untersuchungen der Arbeitsgruppe Prof.

Gebhardt zur Leberfunktion handelte. Einzelne Hormonwerte, wie von Östrogen, LH und FSH, schwankten bei den WT-Kontrollmäusen erheblich oder waren in Einzelfällen nicht bestimmbar. Aus diesem Grund war eine valide Auswertung dieser Hormone nicht möglich. Die Problematik bei der Ermittlung des Hormonstatus könnte teilweise haltungsbedingt verursacht worden sein, so könnte die prämortale Kalorienrestriktion, die aufgrund der parallel laufenden Leberuntersuchungen erfolgte, zu erheblichen, zyklusunabhängigen Schwankungen der Hormonkonzentrationen im Serum geführt haben. Ein weiterer Grund könnte die generell erschwerte Messbarkeit von Hormonen in Mäuseseren sein, weshalb typischerweise Ratten anstelle von Mäusen für reproduktionsbiologische Fragestellungen herangezogen werden (Caligioni, 2009), was hier jedoch infolge der Fragestellung bezüglich der Infertilität in einem Mausmodel nicht möglich war.

Aus diesen Gründen bleibt der genaue Einfluss der hypothalamisch-hypophysären Achse auf die weibliche Infertilität zunächst unklar. Welche hormonelle Rolle dem extensiv hypertrophierten, interstitiellen Grundgewebe in den Ovarien zukommt, wie auch dem verändert vorgefundenen Fettgewebe im Körper, bleibt ebenfalls offen. Die von diesen Geweben normalerweise synthetisierten – bzw. in Östrogene umgewandelten – Androgene könnten dabei einen beträchtlichen lokalen wie systemischen Einfluss auf das Geschehen haben.

Die im Nachgang erhobenen Befunde bei den heterozygoten *Smo*-Mäusen sind dahingehend zu interpretieren, dass die veränderten Ovarien und Vaginen bei den heterozygoten *Smo*-Mäusen wie bei den homozygoten *Smo*-KO-Mäusen nicht einzig auf das in ihnen vorliegende genetische Konstrukt der AFP-/Alb-Cre-Rekombinase zurück zu führen sind. Diese Interpretation findet Unterstützung durch das Antwortschreiben von Mueller und Moriggl auf die Kritikpunkte von Pruniau et al. Die Autoren können die von Pruniau et al. erhobenen Befunde nicht nachvollziehen und führen die geringe Datenlage sowie Unterschiede in der Zucht, Ernährung und Tierhaltung als Ursache für die sich widersprechenden Befunde an (Mueller and Moriggl, 2013).

## 8. AUSBLICK

Das in der Arbeit untersuchte *Smo*-KO-Mausmodell ist von besonderer Bedeutung, da es bei diesem infolge eines primären Leberschadens – und nicht, wie üblich vermutet, infolge einer primär gestörten Ovarialfunktion und -anatomie – zu Veränderungen ähnlich eines PCOS bei Frauen mit Anovulation und Hyperandrogenämie kommt. Es scheint sich somit anzubieten, um Erkenntnisse über die offensichtlich nicht uni-, sondern bidirektionale Gonaden-Hypothalamus-Hypophysen-Leberachse (Mode and Gustafsson, 2006) zu erlangen. Darüber hinaus könnte durch dieses Mausmodell die Frage beantwortet werden, in welcher Weise und auf welchen Wegen es bei einer Alteration des Hh-Signaltransduktionswegs in der Leber, möglicherweise aber auch in anderen Organsystemen, zu systemischen Auswirkungen bis hin zur Infertilität kommen kann. Die vorgestellten Ergebnisse weisen auf Veränderungen im Steroidhormonmetabolismus sowie auf Veränderungen im Metabolismus der insulinähnlichen Wachstumsfaktoren und deren Bindungsproteinen durch die leberspezifische Ausschaltung des Hh-Signaltransduktionswegs hin.

## 9. ZUSAMMENFASSUNG

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

### **Homozygote, leberspezifische *Smoothened*-Knock-out-Mäuse als Modell für eine hepatogen verursachte Ovarialinsuffizienz**

Eingereicht von: Franziska Eplinius, geb. 24.09.1984

angefertigt an den: Instituten für Biochemie und Anatomie  
Medizinische Fakultät der Universität Leipzig

Betreuer: Herr Prof. Dr. Rolf Gebhardt  
Herr PD Dr. Albert Ricken

eingereicht im: April 2015

Die vorliegende Arbeit beschreibt ein Mausmodell, bei dem durch einen leberspezifischen, embryonalen Knock-out (KO) des Membranproteins Smoothened (Smo) und daraus folgender Ausschaltung des Hedgehog- (Hh-) Signaltransduktionswegs in der fetalen Leber der Stoffwechsel bis ins Erwachsenenalter verändert wird. Bisher wurde der Hh-Signaltransduktionsweg vor allem im Zusammenhang mit embryonaler Organreifung und häufiger auch im Zusammenhang mit seinem Einfluss auf das Wachstum bestimmter Malignome diskutiert. Zunehmend wird auch der physiologische Einfluss des Hh-Signaltransduktionswegs auf verschiedene Stoffwechsel-, Wachstums- und Reifungsprozesse in adulten Organen untersucht. In dieser Arbeit wird im Speziellen die infolge des hepatischen KO des Hh-Signaltransduktionswegs auftretende Infertilität der homozygoten, weiblichen *Smo*-KO-Mäuse untersucht.

Die Tiere fallen zunächst durch erhebliche Verpaarungsschwierigkeiten bei der Zucht auf, während die männlichen, homozygoten *Smo*-KO-Mäuse fertil sind. Makroskopisch sind die Reproduktionsorgane der homozygoten *Smo*-KO-Weibchen juvenil entwickelt. Die Vaginen zeigen ein im Aufbau offensichtlich gleichbleibendes Epithel, welches an Vaginalepithelien während des Met-/



Diöstrus erinnert. Dies ist als ein Indiz für einen nicht vorhandenen Ovarialzyklus zu werten. Die Morphologie der Ovarien erhärtet diesen Verdacht. Die Gonaden sind signifikant kleiner als die Ovarien der Wildtyp-Mäuse und imponieren fest und grauweiß. Zwar sind makro- wie mikroskopisch heranwachsende und reifende Follikel zu erkennen, jedoch fehlen sowohl aktuelle Gelbkörper, als auch solche zurückliegender Zyklen. Die Anzahl der heranwachsenden und reifenden Follikel ist eher erniedrigt und die Atresierate in den Gonadotropin-abhängigen Follikeln mit  $\varnothing > 249 \mu\text{m}$  ist signifikant erhöht. Unter den größten Gonadotropin-abhängigen, präovulatorischen Follikeln mit  $\varnothing > 350 \mu\text{m}$  sind bei den *Smo-KO*-Mäusen keine gesunden Follikel mehr zu finden. Die auffallend grauweiße Farbe der Organoberfläche findet ihre Erklärung in einer Hypertrophie des interfollikulären Gewebes. Das Zytoplasma der in Nestern und Ballen liegenden Zellen ist ausgedehnt und schaumig hell. Dies wird durch eine signifikant verminderte Zellkerndichte im Gewebe reflektiert.

In der Zusammenschau sprechen die histopathologischen Befunde für eine schwere Störung der terminalen Follikelreifung mit einer daraus resultierenden Anovulation, was die Infertilität der weiblichen *Smo-KO*-Mäuse erklärt.

In der Leber lässt sich molekularbiologisch auf Transkriptionsebene ein Expressionsmuster nachweisen, welches sich mit einer Hyperandrogenisierung vereinbaren lässt. Insbesondere findet sich das Gen für die 17 $\alpha$ -Hydroxylase/ 17/ 20-Lyase, *Cyp17A1*, welches im Rahmen der Steroidbiosynthese die Synthese des Androgens Dehydroepiandrosteron (DHEA) aus Pregnenolon katalysiert, um ein Vielfaches vermehrt transkribiert, bei gleichzeitiger erniedrigter Transkription des Enzyms 3 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase, welches die Weiterverstoffwechselung von DHEA katalysiert. In der Tat findet sich im Serum der Tiere ein signifikant erhöhter DHEA-Spiegel. Die Konzentration von Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) im Serum ist signifikant erniedrigt, während die Konzentration seines Bindungsproteins IGFBP-1 im Serum erhöht ist. Diese Ergebnisse sind kongruent mit den Ergebnissen der Transkriptionsanalyse von *Igf-1* und *Igfbp-1* in den Lebern der *Smo-KO*-Mäuse der Arbeitsgruppe Prof. Gebhardt am Institut für Biochemie der Universität Leipzig.

Die molekularbiologischen Ergebnisse und die entsprechenden Serumwerte lassen vermuten, dass die Ausschaltung des Hh-Signaltransduktionswegs in der sich entwickelnden Leber den Stoffwechsel der adulten Tiere in Richtung einer hepatisch bedingten Hyperandrogenämie und eines IGF-1-Mangels verändert. Ob diese Veränderung die Reproduktionsorgane der Tiere, insbesondere die Ovarien, direkt beeinflusst oder indirekt, beispielsweise über die Hypothalamo-Hypophysen-Gonaden-Achse oder über eine Mitbeteiligung der adrenalen Hormonsynthese, bleibt in Folgestudien zu prüfen. Auch werden diese zeigen müssen, ob ein späteres Ausschalten des Hh-Signaltransduktionswegs in der Leber ähnliche Wirkung auf die Reproduktionsorgane der Mäuse zeigt wie der embryonale Knock-out des Hh-Signaltransduktionswegs.

Insgesamt finden sich Veränderungen, welche Ähnlichkeiten zum polyzystischen Ovarsyndrom (engl. polycystic ovary syndrome, PCOS) zeigen, welches bei den betroffenen Frauen mit einer Androgenisierung, Anovulation und/ oder zystisch vergrößerten Follikeln einhergeht. Frauen mit einem PCOS zeigen nicht selten auch hepatische Veränderungen wie eine nicht-alkoholische Fettleber, welche jedoch eher als Sekundärpathologie infolge eines PCOS diskutiert wird. Aber auch Frauen mit einer primären Leberschädigung können Fertilitätsstörungen ähnlich eines PCOS zeigen. Die im Rahmen dieser Arbeit bei den Mäusen festgestellten Veränderungen entsprechen dennoch nicht vollständig dem Bild des PCOS beim Menschen. So finden sich unter anderem bei Patientinnen mit einem PCOS eher vergrößerte statt verkleinerte Ovarien, was auf die Akkumulation der zystischen Follikel im Stroma zurückzuführen ist. Auch IGF-1 zeigt sich im Serum dieser Patientinnen eher erhöht bei gleichzeitig erniedrigter Serumkonzentration von IGFBP-1 und ist somit im Vergleich zu den Befunden bei den *Smo*-KO-Mäusen gegensinnig verändert.

Im Wesentlichen bietet das *Smo*-KO-Mausmodell einen möglichen Einblick in die systemischen Einflüsse des Hh-Signaltransduktionswegs in der Leber und zeigt, wie ein primärer, in diesem Falle fetal gesetzter Leberschaden zu einer sekundär auftretenden Infertilität führt.

## 10. LITERATURVERZEICHNIS

**Abbott, D. H., Dumesic, D. A. and Franks, S.** (2002). Developmental origin of polycystic ovary syndrome - a hypothesis. *J Endocrinol* **174**, 1-5.

**Arai, Y., Yamanouchi, K., Mizukami, S., Yanai, R., Shibata, K. and Nagasawa, H.** (1981). Induction of anovulatory sterility by neonatal treatment with 5 beta-dihydrotestosterone in female rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* **96**, 439-43.

**Artini, P. G., Di Berardino, O. M., Simi, G., Papini, F., Ruggiero, M., Monteleone, P. and Cela, V.** (2010). Best methods for identification and treatment of PCOS. *Minerva Ginecol* **62**, 33-48.

**Asagami, T., Holmes, T. H. and Reaven, G.** (2008). Differential effects of insulin sensitivity on androgens in obese women with polycystic ovary syndrome or normal ovulation. *Metabolism* **57**, 1355-60.

**Azziz, R. and Kashar-Miller, M. D.** (2000). Family history as a risk factor for the polycystic ovary syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab* **13 Suppl 5**, 1303-6.

**Azziz, R., Woods, K. S., Reyna, R., Key, T. J., Knochenhauer, E. S. and Yildiz, B. O.** (2004). The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 2745-9.

**Baker, J., Hardy, M. P., Zhou, J., Bondy, C., Lupu, F., Bellve, A. R. and Efstratiadis, A.** (1996). Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol* **10**, 903-18.

**Barker, D. J.** (2004). The developmental origins of adult disease. *J Am Coll Nutr* **23**, 588S-595S.

**Barker, T. E. and Walker, B. E.** (1966). Initiation of irreversible differentiation in vaginal epithelium. *Anat Rec* **154**, 149-59.

**Barnett, K. R., Schilling, C., Greenfeld, C. R., Tomic, D. and Flaws, J. A.** (2006). Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Hum Reprod Update* **12**, 537-55.

**Barsoum, I. B., Bingham, N. C., Parker, K. L., Jorgensen, J. S. and Yao, H. H.** (2009). Activation of the Hedgehog pathway in the mouse fetal ovary leads to ectopic appearance of fetal Leydig cells and female pseudohermaphroditism. *Dev Biol* **329**, 96-103.

**Beinder, E.** (2008). [Fetal growth retardation and diseases in adult life]. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch* **48**, 207-14.

**Belosi, C., Selvaggi, L., Apa, R., Guido, M., Romualdi, D., Fulghesu, A. M. and Lanzone, A.** (2006). Is the PCOS diagnosis solved by ESHRE/ASRM 2003 consensus or could it include ultrasound examination of the ovarian stroma? *Hum Reprod* **21**, 3108-15.

**Berker, B., Emral, R., Demirel, C., Corapcioglu, D., Unlu, C. and Kose, K.** (2004). Increased insulin-like growth factor-I levels in women with polycystic ovary syndrome, and beneficial effects of metformin therapy. *Gynecol Endocrinol* **19**, 125-33.

- Berman, D.M., Karhadkar, S.S., Maitra, A., Montes de Oca, R., Gerstenblith, M. R., Briggs, K., Parker, A. R., Shimada, Y., Eshleman, J. R., Watkins, N. and Beachy, P. A.** (2003). Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* **425**, 846-51.
- Bienvenu, G., Seurin, D., Grellier, P., Froment, P., Baudrimont, M., Monget, P., Le Bouc, Y., Babajko, S.** (2004). Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-6 Transgenic Mice: Postnatal Growth, Brain Development, and Reproduction Abnormalities. *Endocrinology* **145**, 2412-20
- Braeuning, A., Kohle, C., Buchmann, A. and Schwarz, M.** (2011). Coordinate regulation of cytochrome P450 1a1 expression in mouse liver by the aryl hydrocarbon receptor and the beta-catenin pathway. *Toxicol Sci* **122**, 16-25.
- Brzozowska, M. M., Ostapowicz, G. and Weltman, M. D.** (2009). An association between non-alcoholic fatty liver disease and polycystic ovarian syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* **24**, 243-7.
- Burke, Z. D., Reed, K. R., Phesse, T. J., Sansom, O. J., Clarke, A. R. and Tosh, D.** (2009). Liver zonation occurs through a beta-catenin-dependent, c-Myc-independent mechanism. *Gastroenterology* **136**, 2316-2324 e1-3.
- Caligioni, C. S.** (2009). Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr Protoc Neurosci* **Appendix 4**, Appendix 4I.
- Cerda, C., Perez-Ayuso, R. M., Riquelme, A., Soza, A., Villaseca, P., Sir-Petermann, T., Espinoza, M., Pizarro, M., Solis, N., Miquel, J. F. et al.** (2007). Nonalcoholic fatty liver disease in women with polycystic ovary syndrome. *J Hepatol* **47**, 412-7.
- Chafey, P., Finzi, L., Boisgard, R., Cauzac, M., Clary, G., Broussard, C., Pegorier, J. P., Guillonneau, F., Mayeux, P., Camoin, L. et al.** (2009). Proteomic analysis of beta-catenin activation in mouse liver by DIGE analysis identifies glucose metabolism as a new target of the Wnt pathway. *Proteomics* **9**, 3889-900.
- Chapman, J. C., Min, S. H., Freeh, S. M. and Michael, S. D.** (2009). The estrogen-injected female mouse: new insight into the etiology of PCOS. *Reprod Biol Endocrinol* **7**, 47.
- Chung, B. C., Picado-Leonard, J., Haniu, M., Bienkowski, M., Hall, P. F., Shively, J. E. and Miller, W. L.** (1987). Cytochrome P450c17 (steroid 17 alpha-hydroxylase/17,20 lyase): cloning of human adrenal and testis cDNAs indicates the same gene is expressed in both tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 407-11.
- Ciotta, L., Pagano, I., Stracquadanio, M. and Formuso, C.** (2011). Polycystic ovarian syndrome incidence in young women with non-alcoholic epatic steatosis. *Minerva Ginecol* **63**, 429-37.
- Cui, H., Lin, S. Y. and Belsham, D. D.** (2003). Evidence that dehydroepiandrosterone, DHEA, directly inhibits GnRH gene expression in GT1-7 hypothalamic neurons. *Mol Cell Endocrinol* **203**, 13-23.
- Cundy, T. F., Butler, J., Pope, R. M., Saggat-Malik, A. K., Wheeler, M. J. and Williams, R.** (1991). Amenorrhoea in women with non-alcoholic chronic liver disease. *Gut* **32**, 202-6.
- Cutler, G. B., Jr., Glenn, M., Bush, M., Hodgen, G. D., Graham, C. E. and Loriaux, D. L.** (1978). Adrenarche: a survey of rodents, domestic animals, and primates. *Endocrinology* **103**, 2112-8.

- de Koning, N. D. and Haagsma, E. B.** (1990). Normalization of menstrual pattern after liver transplantation: consequences for contraception. *Digestion* **46**, 239-41.
- Damahne, N., Lee, J., Heller, P. and Ruiz I Altaba, A.** (1997). Activation of the transcription factor Gli 1 and the sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours. *Nature* **389**, 876-81.
- Della Torre, S., Rando, G., Meda, C., Stell, A., Chambon, P., Krust, A., Ibarra, C., Magni, P., Ciana, P. and Maggi, A.** (2011). Amino acid-dependent activation of liver estrogen receptor alpha integrates metabolic and reproductive functions via IGF-1. *Cell Metab* **13**, 205-14.
- Demissie, M., Lazic, M., Foecking, E. M., Aird, F., Dunaif, A. and Levine, J. E.** (2008). Transient prenatal androgen exposure produces metabolic syndrome in adult female rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**, E262-8.
- Dodge, M. E. and Lum, L.** (2011). Drugging the cancer stem cell compartment: lessons learned from the hedgehog and Wnt signal transduction pathways. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **51**, 289-310.
- Douglas, N. C., Shah, M. and Sauer, M. V.** (2007). Fertility and reproductive disorders in female solid organ transplant recipients. *Semin Perinatol* **31**, 332-8.
- Dumesic, D. A., Abbott, D. H., Eisner, J. R. and Goy, R. W.** (1997). Prenatal exposure of female rhesus monkeys to testosterone propionate increases serum luteinizing hormone levels in adulthood. *Fertil Steril* **67**, 155-63.
- Dumesic, D. A., Patankar, M. S., Barnett, D. K., Lesnick, T. G., Hutcherson, B. A. and Abbott, D. H.** (2009). Early prenatal androgenization results in diminished ovarian reserve in adult female rhesus monkeys. *Hum Reprod* **24**, 3188-95.
- Economou, F., Xyrafis, X., Livadas, S., Androulakis, II, Argyrakopoulou, G., Christakou, C. D., Kandaraki, E., Palioura, E. and Diamanti-Kandarakis, E.** (2009). In overweight/obese but not in normal-weight women, polycystic ovary syndrome is associated with elevated liver enzymes compared to controls. *Hormones (Athens)* **8**, 199-206.
- Erb, G. E. and Wynne-Edwards, K. E.** (1993). Preimplantation endocrinology in the Djungarian hamster (*Phodopus campbelli*): progesterone, estrogen, corpora lutea, and embryonic development. *Biol Reprod* **49**, 822-830.
- Foecking, E. M. and Levine, J. E.** (2005). Effects of experimental hyperandrogenemia on the female rat reproductive axis: suppression of progesterone-receptor messenger RNA expression in the brain and blockade of luteinizing hormone surges. *Gend Med* **2**, 155-65.
- Foecking, E. M., Szabo, M., Schwartz, N. B. and Levine, J. E.** (2005). Neuroendocrine consequences of prenatal androgen exposure in the female rat: absence of luteinizing hormone surges, suppression of progesterone receptor gene expression, and acceleration of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator. *Biol Reprod* **72**, 1475-83.
- Fottner, C., Engelhardt, D. and Weber, M. M.** (1998). Regulation of steroidogenesis by insulin-like growth factors (IGFs) in adult human adrenocortical cells: IGF-I and, more potently, IGF-II preferentially enhance androgen biosynthesis through interaction with the IGF-I receptor and IGF-binding proteins. *J Endocrinol* **158**, 409-17.
- Franks, S.** (1995). Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* **333**, 853-61.

- Franks, S.** (2008). Polycystic ovary syndrome in adolescents. *Int J Obes (Lond)* **32**, 1035-41.
- Froment, P., Seurin, D., Hembert, S., Levine, J. E., Pisselet, C., Monniaux, D., Binoux, M. and Monget, P.** (2002). Reproductive abnormalities in human IGF binding protein-1 transgenic female mice. *Endocrinology* **143**, 1801-8.
- Gaasenbeek, M., Powell, B.L., Sovio, U., Haddad, L., Gharani, N., Bennett, A., Groves, C.J., Rush, K., Goh, M.J., Conway, G.S., Ruukonen, A., Martikainen, H., Pouta, A., Taponen, S., Hartikainen, A.L., Halford, S., Järvelin, M.R., Franks, S., McCarthy, M.I.** (2004). Large-scale analysis of the relationship between CYP11A promoter variation, polycystic ovary syndrome, and serum testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* **89**(5), 2408-13.
- Gal A, Lin PC, Barger AM, Macneill AL, Ko C** (2014). Vaginal Fold Histology Reduces the Variability Introduced by Vaginal Exfoliative Cytology in the Classification of Mouse Estrous Cycle Stages. *Toxicol Pathol*. 2014 Apr 28. [Epub ahead of print]
- Gambarin-Gelwan, M., Kinkhabwala, S. V., Schiano, T. D., Bodian, C., Yeh, H. C. and Futterweit, W.** (2007). Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol* **5**, 496-501.
- Gebhardt, R.** (1998). Isolation of periportal and pericentral hepatocytes. *Methods Mol Biol* **107**, 319-28.
- Gebhardt, R., Baldysiak-Figiel, A., Krugel, V., Ueberham, E. and Gaunitz, F.** (2007). Hepatocellular expression of glutamine synthetase: an indicator of morphogen actions as master regulators of zonation in adult liver. *Prog Histochem Cytochem* **41**, 201-66.
- Gebhardt, R. and Hovhannisyan, A.** (2010). Organ patterning in the adult stage: the role of Wnt/beta-catenin signaling in liver zonation and beyond. *Dev Dyn* **239**, 45-55.
- Gerlei, Z., Wettstein, D., Rigo, J., Asztalos, L. and Langer, R. M.** (2011). Childbirth after organ transplantation in Hungary. *Transplant Proc* **43**, 1223-4.
- Gilep, A. A., Sushko, T. A. and Usanov, S. A.** (2011). At the crossroads of steroid hormone biosynthesis: The role, substrate specificity and evolutionary development of CYP17. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* **1814**, 200-209.
- Goldman, J. M., Murr, A. S. and Cooper, R. L.** (2007). The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology* **80**, 84-97.
- Goodarzi, M. O., Dumesic, D. A., Chazenbalk, G. and Azziz, R.** (2011). Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. *Nat Rev Endocrinol* **7**, 219-31.
- Govind, A., Obhrai, M. S. and Clayton, R. N.** (1999). Polycystic ovaries are inherited as an autosomal dominant trait: analysis of 29 polycystic ovary syndrome and 10 control families. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 38-43.
- Hahn, S., Tan, S., Sack, S., Kimmig, R., Quadbeck, B., Mann, K. and Janssen, O. E.** (2007). Prevalence of the metabolic syndrome in German women with polycystic ovary syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **115**, 130-5.

- Häggström, M. and Richfield, D.** (2014). Diagram of the pathways of human steroidogenesis. *Wiki J M* 1, 1, DOI:10.15347/wjm/2014.005. ISSN 20018762.
- Hogg, K., McNeilly, A. S. and Duncan, W. C.** (2010). Prenatal androgen exposure leads to alterations in gene and protein expression in the ovine fetal ovary. *Endocrinology* **152**, 2048-59.
- Hogg, K., Wood, C., McNeilly, A. S. and Duncan, W. C.** (2011). The in utero programming effect of increased maternal androgens and a direct fetal intervention on liver and metabolic function in adult sheep. *PLoS One* **6**, e24877.
- Huang, C. C. and Yao, H. H.** (2010). Diverse functions of Hedgehog signaling in formation and physiology of steroidogenic organs. *Mol Reprod Dev* **77**, 489-96.
- Huang, C. T., Weitsman, S. R., Dykes, B. N. and Magoffin, D. A.** (2001). Stem cell factor and insulin-like growth factor-I stimulate luteinizing hormone-independent differentiation of rat ovarian theca cells. *Biol Reprod* **64**, 451-6.
- Huang, H., Rajkumar, K. and Murphy, L. J.** (1997). Reduced fecundity in insulin-like growth factor-binding protein-1 transgenic mice. *Biol Reprod* **56**, 284-9.
- Iwashita, M., Mimuro, T., Watanabe, M., Setoyama, T., Matsuo, A., Adachi, T., Takeda, Y. and Sakamoto, S.** (1990). Plasma levels of insulin-like growth factor-I and its binding protein in polycystic ovary syndrome. *Horm Res* **33 Suppl 2**, 21-6.
- Jacob, L. S., Wu, X., Dodge, M. E., Fan, C. W., Kulak, O., Chen, B., Tang, W., Wang, B., Amatruda, J. F. and Lum, L.** (2011). Genome-wide RNAi screen reveals disease-associated genes that are common to Hedgehog and Wnt signaling. *Sci Signal* **4**, ra 4.
- Jasmani, S., Ohira, T., Jayasankar, V., Tsutsui, N., Aida, K. and Wilder, M. N.** (2004). Localization of vitellogenin mRNA expression and vitellogenin uptake during ovarian maturation in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* **301**, 334-43.
- Jayasankar, V., Jasmani, S., Tsutsui, N., Aida, K. and Wilder, M. N.** (2006). Dynamics of vitellogenin synthesis in juvenile giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* **305**, 440-8.
- Jonard, S. and Dewailly, D.** (2004). The follicular excess in polycystic ovaries, due to intra-ovarian hyperandrogenism, may be the main culprit for the follicular arrest. *Hum Reprod update* **10**, 107-117.
- Jonard, S., Robert, Y. and Dewailly, D.** (2005). Revisiting the ovarian volume as a diagnostic criterion for polycystic ovaries. *Hum Reprod* **20**, 2893-8.
- Kadakia, R., Arraztoa, J. A., Bondy, C. and Zhou, J.** (2001). Granulosa cell proliferation is impaired in the Igf1 null ovary. *Growth Horm IGF Res* **11**, 220-4.
- Kagabu, S. and Umez, M.** (2004). Histological analysis of the 'critical point' in follicular development in mice. *Reproductive Medicine and Biology* **3**, 141-145.
- Kallen, C.B., Arakane, F., Christenson, L. K., Watari, H., Devoto, L., Strauss, J.F. 3rd** (1998). Unveiling the mechanism of action and regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. *Mol Cell Endocrinol* **145(1-2)**, 39-45.

**Kashar-Miller, M. and Azziz, R.** (1999). Heritability and the risk of developing androgen excess. *J Steroid Biochem Mol Biol* **69**, 261-8.

**Katagiri, M., Tatsuta, K., Imaoka, S., Funae, Y., Honma, K., Matsuo, N., Yokoi, H., Ishimura, K., Ishibashi, F. and Kagawa, N.** (1998). Evidence that immature rat liver is capable of participating in steroidogenesis by expressing 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase P450c17. *J Steroid Biochem Mol Biol* **64**, 121-8.

**Kauffman, R. P., Baker, T. E., Baker, V., Kauffman, M. M. and Castracane, V. D.** (2010). Endocrine factors associated with non-alcoholic fatty liver disease in women with polycystic ovary syndrome: do androgens play a role? *Gynecol Endocrinol* **26**, 39-46.

**Kellendonk, C., Opherk, C., Anlag, K., Schutz, G. and Tronche, F.** (2000). Hepatocyte-specific expression of Cre recombinase. *Genesis* **26**, 151-3.

**Koga, M., Saito, H., Mukai, M., Saibara, T. and Kasayama, S.** (2011). Serum dehydroepiandrosterone sulphate levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Intern Med* **50**, 1657-61.

**Lade, A. G. and Monga, S. P.** (2011). Beta-catenin signaling in hepatic development and progenitors: which way does the WNT blow? *Dev Dyn* **240**, 486-500.

**Laifer, S. A. and Guido, R. S.** (1995). Reproductive function and outcome of pregnancy after liver transplantation in women. *Mayo Clin Proc* **70**, 388-94.

**Land, R.B.** (1978). Genetic improvement of mammalian fertility: A review of opportunities. *Animal Reproduction Science* **1**, 109-135.

**Lara, H. E., Dissen, G. A., Leyton, V., Paredes, A., Fuenzalida, H., Fiedler, J. L. and Ojeda, S. R.** (2000). An Increased Intraovarian Synthesis of Nerve Growth Factor and Its Low Affinity Receptor Is a Principal Component of Steroid-Induced Polycystic Ovary in the Rat. *Endocrinology* **141**, 1059-1072.

**Le Goascogne, C., Sananès, N., Gouézou, M., Takemori, S., Kominami, S., Baulieu, E. E. and Robel, P.** (1991). Immunoreactive cytochrome P-45017 $\beta$  in rat and guineapig gonads, adrenal glands and brain, vol. 93, pp. 609-622.

**Lee, G. Y., Croop, J. M. and Anderson, E.** (1998). Multidrug resistance gene expression correlates with progesterone production in dehydroepiandrosterone-induced polycystic and equine chorionic gonadotropin-stimulated ovaries of prepubertal rats. *Biol Reprod* **58**, 330-7.

**Lee, K., Jeong, J., Kwak, I., Yu, C. T., Lanske, B., Soegiarto, D. W., Toftgard, R., Tsai, M. J., Tsai, S., Lydon, J. P. et al.** (2006). Indian hedgehog is a major mediator of progesterone signaling in the mouse uterus. *Nat Genet* **38**, 1204-9.

**Legan, M., Kocijancic, A., Prezelj, J., Osredkar, J. and Fisker, S.** (2002). GH-IGF-I axis in non-obese women with functional hyperandrogenism. *J Endocrinol Invest* **25**, 691-5.

**Legro, R. S.** (2000). The genetics of obesity. Lessons for polycystic ovary syndrome. *Ann N Y Acad Sci* **900**, 193-202.

**Legro, R. S., Spielman, R., Urbanek, M., Driscoll, D., Strauss, J. F., 3rd and Dunaif, A.** (1998). Phenotype and genotype in polycystic ovary syndrome. *Recent Prog Horm Res* **53**, 217-56.

**Lerchbaum, E., Gruber, H. J., Schwetz, V., Giuliani, A., Moller, R., Pieber, T. R. and Obermayer-Pietsch, B.** (2011). Fatty liver index in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* **165**, 935-43.



**Li, S. and Davis, B.** (2007). Evaluating rodent vaginal and uterine histology in toxicity studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* **80**, 246-52.

**Lippert, H.** (2003). Lehrbuch Anatomie. 6. Auflage. Elsevier GmbH, München, 407-11.

**Loeppen, S., Koehle, C., Buchmann, A. and Schwarz, M.** (2005). A beta-catenin-dependent pathway regulates expression of cytochrome P450 isoforms in mouse liver tumors. *Carcinogenesis* **26**, 239-48.

**MacLennan, M. B., Anderson, B. M. and Ma, D. W.** (2011). Differential mammary gland development in FVB and C57Bl/6 mice: implications for breast cancer research. *Nutrients* **3**, 929-36.

**Magoffin, D. A. and Weitsman, S. R.** (1994). Insulin-like growth factor-I regulation of luteinizing hormone (LH) receptor messenger ribonucleic acid expression and LH-stimulated signal transduction in rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol Reprod* **51**, 766-75.

**Manneras, L., Cajander, S., Holmang, A., Seleskovic, Z., Lystig, T., Lonn, M. and Stener-Victorin, E.** (2007). A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* **148**, 3781-91.

**Matz-Soja, M., Hovhannisyan, A., Gebhardt, R.** (2013). Hedgehog signalling pathway in adult liver: A major new player in hepatocyte metabolism and zonation. *Med Hypotheses* **80(5)**, 589-94

**Matz-Soja, M., Aleithe, S., Marbach, E., Böttger, J., Arnold, K., Schmidt-Heck, W., Kratzsch, J. and Gebhardt, R.** (2014). Hepatic Hedgehog signalling contributes to the regulation of IGF1 and IGFBP1 serum levels. *Cell Communication and Signaling* **12**, 11

**Mesiano, S., Katz, S. L., Lee, J. Y. and Jaffe, R. B.** (1997). Insulin-like growth factors augment steroid production and expression of steroidogenic enzymes in human fetal adrenal cortical cells: implications for adrenal androgen regulation. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 1390-6.

**Migone, F. F., Ren, Y., Cowan, R. G., Harman, R. M., Nikitin, A. Y. and Quirk, S. M.** (2012). Dominant activation of the hedgehog signaling pathway alters development of the female reproductive tract. *Genesis* **50**, 28-40.

**Mode, A. and Gustafsson, J. A.** (2006). Sex and the liver - a journey through five decades. *Drug Metab Rev* **38**, 197-207.

**Morales, A. J., Nolan, J. J., Nelson, J. C. and Yen, S. S.** (1994). Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age. *J Clin Endocrinol Metab* **78**, 1360-7.

**Motta, A. B.** (2010). Dehydroepiandrosterone to induce murine models for the study of polycystic ovary syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol* **119**, 105-11.

**Mueller, K. M., Kornfeld, J. W., Friedbichler, K., Blaas, L., Egger, G., Esterbauer, H., Hasselblatt, P., Schleder, M., Haindl, S., Wagner, K. U. et al.** (2011). Impairment of hepatic growth hormone and glucocorticoid receptor signaling causes steatosis and hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology* **54**, 1398-409.

**Mueller, K. M. and Moriggl, R.** (2013). Reply. *Hepatology* **58**, 2210.

**Myers, M., Britt, K. L., Wreford, N. G., Ebling, F. J. and Kerr, J. B.** (2004). Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reproduction* **127**, 569-80.

**Nelson, J. F., Felicio, L. S., Randall, P. K., Sims, C. and Finch, C. E.** (1982). A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. *Biol Reprod* **27**, 327-39.

**Nelson, V. L., Legro, R. S., Strauss, J. F., 3rd and McAllister, J. M.** (1999). Augmented androgen production is a stable steroidogenic phenotype of propagated theca cells from polycystic ovaries. *Mol Endocrinol* **13**, 946-57.

**Nusslein-Volhard, C. and Wieschaus, E.** (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**, 795-801.

**Oakberg, E. F.** (1979). Follicular growth and atresia in the mouse. *In Vitro* **15**, 41-9.

**Orio, F., Jr., Palomba, S., Colao, A., Russo, T., Dentico, C., Tauchmanova, L., Savastano, S., Nappi, C., Sultan, C., Zullo, F. et al.** (2003). GH release after GHRH plus arginine administration in obese and overweight women with polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest* **26**, 117-22.

**Osman, P.** (1985). Rate and course of atresia during follicular development in the adult cyclic rat. *J Reprod Fertil* **73**, 261-270.

**Pallares, P., Garcia-Fernandez, R. A., Criado, L. M., Letelier, C. A., Fernandez-Toro, J. M., Esteban, D., Flores, J. M. and Gonzalez-Bulnes, A.** (2010). Substantiation of Ovarian Effects of Leptin by Challenging a Mouse Model of Obesity/ Type 2 Diabetes. *Theriogenology* **73**, 1088-1095.

**Parkes, A. S.** (1928). The Length of the Oestrous Cycle in the Unmated Normal Mouse: Records of One Thousand Cycles. *J Exp Biol* **5**, 371-377.

**Parolin, M. B., Rabinovitch, I., Urbanetz, A. A., Scheidemantel, C., Cat, M. L. and Coelho, J. C.** (2004). Impact of successful liver transplantation on reproductive function and sexuality in women with advanced liver disease. *Transplant Proc* **36**, 943-4.

**Peng, Z., Wong, J.W., Hansen, E.C., Puchlopek-Dermenci A.L. and Clarke H.J.** (2014). Development of a concise, asymmetric synthesis of a smoothened receptor (SMO) inhibitor: enzymatic transamination of a 4-piperidinone with dynamic kinetic resolution. *Org Lett* **16(3)**, 860-3

**Pomeroy, S.L., Tamayo, P., Gaasenbeek, M., Sturla, L.M., Angelo, M., McLaughlin, M.E., Kim, J.Y.H., Goumnerova, L.C., Black, P.M., Lau, C., Allen, J.C., Zagzag, D., Olson, J.M., Curran, T., Wetmore, C., Biegel, J.A., Poggio, T., Mukherjee, S., Rifkin, R., Califano, A., Stolovitzky, G., Louis, D.N., Mesirov, J.P., Lander, E.S. and Golub, T.R.** (2002). Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. *Nature* **415**, 436-42.

**Porter, M. B.** (2008). Polycystic ovary syndrome: the controversy of diagnosis by ultrasound. *Semin Reprod Med* **26**, 241-51.

**Pruniau, V. P., Louagie, E., Brouwers, B., Declercq, J. and Creemers, J. W.** (2013). The AlfpCre mouse revisited: Evidence for liver steatosis related to growth hormone deficiency. *Hepatology* **58**, 2209-10.

**Rangwala, F., Guy, C. D., Lu, J., Suzuki, A., Burchette, J. L., Abdelmalek, M. F., Chen, W., Diehl, A. M.** (2011). Increased Production of Sonic Hedgehog by Ballooned Hepatocytes. *J Pathol* **224**, 401-410.

**Ren, Y., Cowan, R. G., Harman, R. M. and Quirk, S. M.** (2009). Dominant activation of the hedgehog signaling pathway in the ovary alters theca development and prevents ovulation. *Mol Endocrinol* **23**, 711-23.

**Ren, Y., Cowan, R. G., Migone, F. F. and Quirk, S. M.** (2012). Over-Activation of Hedgehog Signaling Alters Development of the Ovarian Vasculature in Mice. *Biol Reprod*.

**Rhind, S. M., Rae, M. T. and Brooks, A. N.** (2003). Environmental influences on the fetus and neonate--timing, mechanisms of action and effects on subsequent adult function. *Domest Anim Endocrinol* **25**, 3-11.

**Roy, S., Mahesh, V. B. and Greenblatt, R. B.** (1962). Effect of dehydroepiandrosterone and delta4-androstenedione on the reproductive organs of female rats: production of cystic changes in the ovary. *Nature* **196**, 42-3.

**Russell, M. C., Cowan, R. G., Harman, R. M., Walker, A. L. and Quirk, S. M.** (2007). The hedgehog signaling pathway in the mouse ovary. *Biol Reprod* **77**, 226-36.

**Sathyapalan, T. and Atkin, S. L.** (2012). Recent advances in cardiovascular aspects of polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* **166**, 575-83.

**Savabieasfahani, M., Lee, J. S., Herkimer, C., Sharma, T. P., Foster, D. L. and Padmanabhan, V.** (2005). Fetal programming: testosterone exposure of the female sheep during midgestation disrupts the dynamics of its adult gonadotropin secretion during the periovulatory period. *Biol Reprod* **72**, 221-9.

**Setji, T. L., Holland, N. D., Sanders, L. L., Pereira, K. C., Diehl, A. M. and Brown, A. J.** (2006). Nonalcoholic steatohepatitis and nonalcoholic Fatty liver disease in young women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **91**, 1741-7.

**Sheehan, M. T.** (2004). Polycystic ovarian syndrome: diagnosis and management. *Clin Med Res* **2**, 13-27.

**Soroka, Y., Milner, Y. and Sagi, A.** (2000). The hepatopancreas as a site of yolk protein synthesis in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Invertebrate Reproduction & Development* **37**, 61-68.

**Spaniel-Borowski, K., Petterborg, L. J. and Reiter, R. J.** (1983). Morphological and morphometric changes in the ovaries of white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) following exposure to long or short photoperiod. *Anat Rec* **205**, 13-9.

**Spicer, L. J., Sudo, S., Aad, P. Y., Wang, L. S., Chun, S. Y., Ben-Shlomo, I., Klein, C. and Hsueh, A. J.** (2009). The hedgehog-patched signaling pathway and function in the mammalian ovary: a novel role for hedgehog proteins in stimulating proliferation and steroidogenesis of theca cells. *Reproduction* **138**, 329-39.

**Stein I. F., Leventhal M. L.** (1935). Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *AmJ Obstet Gynecol* **29**, 181-191.

**Suzuki, A., Enari, M., Abe, Y., Ohta, Y. and Iguchi, T.** (1996). Effect of ovariectomy on histological change and protein expression in female mouse reproductive tracts. *In Vivo* **10**, 103-10.

**Szollosi, D., Szollosi, M. S., Czolowska, R. and Tarkowski, A. K.** (1990). Sperm penetration into immature mouse oocytes and nuclear changes during maturation: an EM study. *Biol Cell* **69**, 53-64.

**Szukiewicz, D. and Uilenbroek, J. T.** (1998). Polycystic ovary syndrome--searching for an animal model. *J Med* **29**, 259-75.

**Tagawa, N., Katagiri, M. and Kobayashi, Y.** (2006). Developmental changes of serum steroids produced by cytochrome P450c17 in rat. *Steroids* **71**, 165-70.

**Tan, S., Bechmann, L. P., Benson, S., Dietz, T., Eichner, S., Hahn, S., Janssen, O. E., Lahner, H., Gerken, G., Mann, K. et al.** (2010). Apoptotic markers indicate nonalcoholic steatohepatitis in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **95**, 343-8.

**Teixeira, R. J., Silva, V. C., Gazolla, H. M., Cunha, S. B. and Guimaraes, M. M.** (2002). The relationship between ovarian structure and serum insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I) and its binding protein (IGFBP-1 and IGFBP-3) levels in premature pubarche. *J Pediatr Endocrinol Metab* **15**, 69-75.

**Thierry van Dessel, H. J., Chandrasekher, Y., Yap, O. W., Lee, P. D., Hintz, R. L., Faessen, G. H., Braat, D. D., Fauser, B. C. and Giudice, L. C.** (1996). Serum and follicular fluid levels of insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, and IGF-binding protein-1 and -3 during the normal menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* **81**, 1224-31.

**Thierry van Dessel, H. J., Lee, P. D., Faessen, G., Fauser, B. C. and Giudice, L. C.** (1999). Elevated serum levels of free insulin-like growth factor I in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 3030-5.

**Van Der Schoot, P.** (1975). Micro-organisms and the appearance of leucocytes in the vaginal wall of cyclic female rats at metoestrus. *J Reprod Fertil* **45**, 61-8.

**Van Ebbenhorst Tengbergen, W. J.** (1955). The morphology of the mouse anterior pituitary during the oestrous cycle. *Acta Endocrinol (Copenh)* **18**, 213-8.

**Vassilatou, E., Lafoyianni, S., Vryonidou, A., Ioannidis, D., Kosma, L., Katsoulis, K., Papavassiliou, E. and Tzavara, I.** (2010). Increased androgen bioavailability is associated with non-alcoholic fatty liver disease in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* **25**, 212-20.

**Veiga-Lopez, A., Ye, W., Phillips, D. J., Herkimer, C., Knight, P. G. and Padmanabhan, V.** (2008). Developmental programming: deficits in reproductive hormone dynamics and ovulatory outcomes in prenatal, testosterone-treated sheep. *Biol Reprod* **78**, 636-47.

**Vianello, S., Waterman, M. R., Dalla Valle, L. and Colombo, L.** (1997). Developmentally regulated expression and activity of 17alpha-hydroxylase/C-17,20-lyase cytochrome P450 in rat liver. *Endocrinology* **138**, 3166-74.

**Vinson, G. P., Whitehouse, B. J. and Goddard, C.** (1978). Steroid 17-Hydroxylation and Androgen Production by Incubated Rat Adrenal-Tissue. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **9**, 677-683.

**Vorachek, W. R., Steppan, C. M., Lima, M., Black, H., Bhattacharya, R., Wen, P., Kajiyama, Y. and Locker, J.** (2000). Distant enhancers stimulate the albumin promoter through complex proximal binding sites. *J Biol Chem* **275**, 29031-41.

**Voutilainen, R. and Miller, W. L.** (1986). Developmental expression of genes for the steroidogenic enzymes P450scc (20,22-desmolase), P450c17 (17 alpha-hydroxylase/17,20-lyase), and P450c21 (21-hydroxylase) in the human fetus. *J Clin Endocrinol Metab* **63**, 1145-50.

**Webber, L. J., Stubbs, S., Stark, J., Trew, G. H., Margara, R., Hardy, K. and Franks, S.** (2003). Formation and early development of follicles in the polycystic ovary. *Lancet* **362**, 1017-21.

**Webber, L. J., Stubbs, S. A., Stark, J., Margara, R. A., Trew, G. H., Lavery, S. A., Hardy, K. and Franks, S.** (2007). Prolonged survival in culture of preantral follicles from polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 1975-8.

**Westwood, F. R.** (2008). The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicol Pathol* **36**, 375-84.

**Wiebold, J. L. and Becker, W. C.** (1987). Inequality in function of the right and left ovaries and uterine horns of the mouse. *J Reprod Fertil* **79**, 125-34.

**Wood, J. R., Ho, C. K., Nelson-Degrave, V. L., McAllister, J. M. and Strauss, J. F., 3rd.** (2004). The molecular signature of polycystic ovary syndrome (PCOS) theca cells defined by gene expression profiling. *J Reprod Immunol* **63**, 51-60.

**Xu, N., Kwon, S., Abbott, D. H., Geller, D. H., Dumesic, D. A., Azziz, R., Guo, X. and Goodarzi, M. O.** (2011). Epigenetic Mechanism Underlying the Development of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS)-Like Phenotypes in Prenatally Androgenized Rhesus Monkeys. *PLoS One* **6**, e27286.

**Zhou, J., Bievre, M. and Bondy, C. A.** (2000). Reduced GLUT1 expression in Igf1-/- null oocytes and follicles. *Growth Horm IGF Res* **10**, 111-7.

## **11. ERKLÄRUNG ÜBER DIE EIGENSTÄNDIGE ABFASSUNG DER ARBEIT**

Hiermit erkläre ich, Franziska Eplinius, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe durch Dritte oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die für das Entstehen dieser Dissertation relevant waren und dass die vorgelegte Promotionsschrift weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Weise einer anderen Prüfungskommission zum Zweck der Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen oder von anderen Personen übernommene Material, welches in der Arbeit verwendet wurde oder auf welches direkt Bezug genommen wurde ist als solches gekennzeichnet. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und persönlich an dem Entstehen der Promotionsschrift beteiligt waren.

Leipzig, den

Franziska Eplinius

## 12. CURRICULUM VITAE

### Persönliche Angaben

---

Geburtsdatum	24.09.1984
Geburtsort	Berlin
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Anschrift	Judith-Auer-Straße 12, 04317 Leipzig
Telefon/ Mail	0176/21908349, f.epli@gmx.de

### Forschung und Publikationen

---

11`2014	“Acute aortic dissection caused by Clostridium septicum aortitis”, Eplinius F., Hädrich C., <i>Forensic Sci Int.</i>
Seit 2012	Mitglied der „Technical Working Group Postmortem Angiography Methods“ (TWGPAM), Beteiligung an multizentrischer Studie zur Validierung der postmortalen CT-Angiographie
02`2012	„Unstable EEG-vigilance in patients with cancer-related-fatigue (CRF) in comparison to healthy controls“, Olbrich S., Sander C., Jahn I. Eplinius F., Claus S., Mergl R., Schönknecht P., Hegerl U., <i>World J Biol Psychiatry</i>

### Berufliche Tätigkeiten

---

seit 02`2015	Ärztin in Weiterbildung, Abteilung für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Herzzentrum Leipzig, Chefarzt Prof. Dr. med. Matthias Gutberlet
07`2014 – 10`2014	Ärztin in Weiterbildung, Institut für Rechtsmedizin, Universität Zürich, Institutsdirektor Prof. Dr. med. Michael Thali
06`2012 – 06`2014	Ärztin in Weiterbildung, Institut für Rechtsmedizin, Universität Leipzig, Institutsdirektor Prof. Dr. med. Jan Dreßler

### Universitäre Ausbildung

---

05`2012	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: Gut
2011 – 2012	Praktisches Jahr
2007 – 2012	Studium der Medizin, Klinik, Universität Leipzig
09`2007	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: Sehr gut
2005 – 2007	Studium der Medizin, Vorklinik, Universität Leipzig

### **Schulische Ausbildung**

---

2004	Allgemeine Hochschulreife, Note: 2,0
1997 – 2004	Herder-Gymnasium, Berlin
1991 – 1997	Reinhold-Otto-Grundschule, Berlin

### **Weiterbildung**

---

07`2013 – 11`2013	Hospitation Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie Universitätsklinikum Leipzig, Chefarzt Prof. Dr. med. T. Kahn
02`2009	Kurs Tropenmedizin, 6 Wochen, Universität Leipzig, Note: Sehr gut
2009	Impfkurs, Universität Leipzig

### **Kenntnisse und Fähigkeiten**

---

Sprachen	Englisch (fließend), Französisch
EDV	Gute Kenntnisse in MS Office, SPSS, Wissenschaftsportalen (Pubmed o.ä.)
Computertomografie	Bedienung Philips MX8000 2 Slice CT-Scanner, Philips Brilliance Workspace

### **Weitere Tätigkeiten**

---

2009 – 2011	Studentische Hilfskraft im Pflegedienst Herzzentrum Leipzig
2008 – 2009	Studentische Hilfskraft, neurophysiologische Untersuchungen, Klinik und Poliklinik für Psychiatrie Universität Leipzig
2004 – 2005	Work and Travel, Australien

Leipzig, den

Franziska Eplinius



### 13. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rolf Gebhardt vom Institut für Biochemie der Universität Leipzig für das Überlassen des Themas und für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe daran arbeiten zu können. Sein fachlicher und materieller Beistand haben diese Dissertation möglich gemacht.

Herrn Prof. Dr. Ingo Bechmann vom Institut für Anatomie danke ich sehr, dass ich in seinem Haus die Gewebe und Organe lichtmikroskopisch aufarbeiten, beurteilen und dokumentieren durfte.

Mein herzlicher Dank gilt meinem zweiten Betreuer, Herrn PD Dr. Albert Ricken, vom Institut für Anatomie für seine histopathologische Expertise, sowie für sein Engagement, seine Geduld und seine große editorielle Unterstützung beim Abfassen der vorliegenden Arbeit.

Ebenso sehr großer Dank geht an Frau Dr. Madlen Matz-Soja vom Institut für Biochemie für ihre große Hilfe bei der Tierpräparation sowie für die mir gewährten Einblicke und Unterstützung bei den biochemischen Labormethoden wie der qRTPCR.

Ich danke allen Mitarbeitern aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Rolf Gebhardt, insbesondere Frau Doris Mahn sowie Frau Kerstin Heise für ihre Unterstützung im täglichen Laboralltag und am Mikrotom.

Ich danke den Mitarbeitern des Instituts für Anatomie der Universität Leipzig für ihre große Hilfsbereitschaft, namentlich erwähnen möchte ich Frau Angela Ehrlich und insbesondere Frau Claudia Merkwitz, für Ihre unschätzbare Hilfe bei der Anfertigung der Ovarschnittserien, ohne die die Organschnitte wohl voller Schnittartefakte geblieben wären.

Meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, Carmen Bartzke-Eplinius, sowie meiner Großmutter, Hildegard Bartzke, gilt mein besonderer Dank. Durch Euch wurde für mich das Studium der Medizin überhaupt erst möglich. Ihr habt immer an mich geglaubt und mich auf meinem Weg bestärkt! Sehr hätte ich mich gefreut, wenn Du, liebe Omi, meinen Weg zum Dr. med. bis zum Abschluss der Arbeit hättest erleben können.

Meinem wundervollen Mann, Ronny Bayer, danke ich für seine große mentale Unterstützung und sein pedantisches Lektorat, was die vorliegende Arbeit in Form brachte.

Bei all meinen Freunden möchte ich mich bedanken, dass sie mich auf meinem Weg zur Promotion so liebevoll begleitet haben, und mir Kraft und Zuversicht gespendet haben, wenn die Doktorarbeit mal weniger rund lief.